

**Identifizierung und Charakterisierung des Tubulysin-
Biosynthesegenclusters aus dem Myxobakterium
Angiococcus disciformis An d48**

**Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
Dissertation**

**von Axel Sandmann
aus Braunschweig**

1. Referent: Prof. Dr. Rolf Müller
2. Referent: Prof. Dr. Ludger Beerhues
eingereicht am: 26.02.2004
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.04.2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Kopp, M., Irschik, H., Gross, F., Perlova, O., Sandmann, A., Gerth, K. & Müller, R. (2004) *J Biotechnol* **107**, 29-40

Sandmann, A., Sasse, F. & Müller, R.: Identification and analysis of the biosynthetic machinery of tubulysin, a potent cytotoxin with potential anticancer activity (eingereicht)

Höfle, G., Müller, R., Sasse, F. und Sandmann, A. (GBF) DE 102 41 152.2 (05.03.2004)

Tagungsbeiträge

Sandmann, A., Sasse, F., Hinkelmann, B. & Müller, R. (2002) Search for genes involved in the production of bioactive secondary metabolites using a *mariner* based transposon mutagenesis in the Myxobacterium *Angiococcus disciformis* An d48. In: Schreiber, C. (Ed), Jahrestagung der Vereinigung für Allgemeine und Angewandte Mikrobiologie (VAAM), Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Germany, pp66

Sandmann, A., Sasse, F., Hinkelmann B. & Müller R.: Aufklärung des Tubulysin-Biosyntheseclusters im Myxobakterium *Angiococcus disciformis* durch *mariner* basierende Transposon-Mutagenese (Vortrag 7) Workshop der VAAM, 29.09.-01.10.2002, Freiburg, Germany

Sandmann, A., Sasse, F., Hinkelmann B. & Müller R.: Aufklärung des Tubulysin-Biosyntheseclusters im Myxobakterium *Angiococcus disciformis* durch *mariner* basierende Transposon-Mutagenese (Vortrag) 23. Tübinger-Göttinger Gespräche zur Chemie von Mikroorganismen, 11.-13.09.2002, Blaubeuren, Germany

Sandmann, A., Frank, B. & Müller, R.: Identification of genes involved in the regulation of secondary metabolism in the myxobacterium *Angiococcus disciformis* An d48 (Poster 75) Biology of streptomycetes and related actinomycetes, 27.03.-03.03.2003, Münster, Germany

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Myxobakterien	1
1.2	Sekundärmetabolite aus Myxobakterien	2
1.3	Potentielle Cytostatika aus Myxobakterien	3
1.4	Biosynthese von Naturstoffen durch Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen	7
1.4.1	Funktionsweise von Polyketidsynthasen	7
1.4.2	Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen	11
1.5	Tubulysin	13
1.6	Hypothese zum Aufbau des Tubulysin-Biosynthese Genclusters	16
1.7	Zielsetzung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Chemikalien	18
2.1.1	Enzyme und „Fertig-Gebrauchs-Kits“	19
2.1.2	Lösungen, Puffer und Medien	20
2.1.2.1	Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	20
2.1.2.2	Kulturmedien und Stocklösungen für die Anzucht von Bakterien	22
2.1.2.2.1	Kulturmedien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i> Stämmen	22
2.1.2.2.2	Kulturmedien für die Anzucht von Myxobakterien	23
2.1.2.2.3	Antibiotikastocklösungen	24
2.2	Mikroorganismen	24
2.3	Plasmide	25
2.3.1	Verwendete Plasmide	25
2.3.1.1	Das Plasmid pMycoMar	25
2.3.1.2	Konstruierte Plasmide	26
2.3.2	Oligonucleotide	30
2.3.3	Geräte	37
2.4	Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen	39
2.4.1	Kultivierung und Konservierung von <i>Escherichia coli</i> Stämmen	39
2.4.2	Kultivierung und Konservierung von Myxobakterien	39

2.4.2.1	Kultivierung von <i>Stigmatella erecta</i> Pd e68	40
2.4.2.2	Kultivierung von <i>Angiococcus disciformis</i> An d48	41
2.4.2.2.1	Kultivierung von <i>Angiococcus disciformis</i> An d48 in Mikrotiterplatten	41
2.4.3	Kulturextrakte	42
2.4.3.1	Extraktion aus 50 ml Kulturen	42
2.4.3.2	Extraktion aus Mikrotiterplatten	42
2.4.4	Kultivierung von Zelllinien	43
2.5	Molekularbiologische Methoden	43
2.5.1	Isolierung chromosomaler DNA aus Myxobakterien	43
2.5.1.1	Isolierung chromosomaler DNA nach Neumann <i>et al.</i> (1992)	44
2.5.1.2	Isolierung chromosomaler DNA mit Puregene (Gentra Systems)	44
2.5.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.5.2.1	Alkalische Lyse nach Sambrook <i>et al.</i> (1989)	45
2.5.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA mit „Boiling“-Präparation	46
2.5.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleospin® Plasmid-Kit	46
2.5.2.4	Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond® AX 100-Kit	47
2.5.3	DNA-Fällung	47
2.5.4	Bestimmung der DNA-Konzentration	48
2.5.5	Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen	48
2.5.5.1	Spaltung chromosomaler DNA	48
2.5.5.2	Spaltung von Plasmid-DNA	48
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	49
2.5.7	DNA-Extraktion aus Agarosegelen	49
2.5.8	Dephosphorylierung von DNA	50
2.5.9	Ligation von DNA	50
2.5.10	Transformation von <i>E. coli</i> Zellen durch Elektroporation	51
2.5.10.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> Zellen	51
2.5.10.2	Elektrotransformation von <i>E. coli</i> Zellen	52
2.5.11	Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem TOPO TA Cloning®-Kit	52
2.5.11.1	Klonierung, Transformation und blau-weiß Selektion	53
2.5.12	Erstellen einer Cosmidbank	53
2.5.12.1	Sau3A Partial-Restriktion chromosomaler DNA aus <i>A. disciformis</i> An d48	54
2.5.12.2	Ligation des partial hydrolysierten Chromosoms in den SuperCos-Vektor	54
2.5.12.3	<i>In vitro</i> Verpackung der Cosmide in λ-Bakteriophagen	55
2.5.12.4	Bestimmung des Phagentiters und Transfektion von <i>E. coli</i> SURE-Zellen	55
2.5.12.5	Herstellung einer Membran-Kopie der Cosmidbank	56
2.5.13	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	57

2.5.13.1	Standardprotokoll einer PCR-Amplifikation	58
2.5.13.2	Aufreinigung von PCR-Produkten	59
2.5.14	Southern-Blot	59
2.5.14.1	Vakkumblot	60
2.5.14.2	Sondenmakierung	60
2.5.14.3	Hybridisierung und Detektion	61
2.5.14.4	Koloniehybridisierung	62
2.5.15	Transformation von Myxobakterien durch Elektroporation	62
2.5.15.1	Elektrotransformation von <i>A. disciformis</i> An d48 nach Beyer <i>et al.</i> 1999	62
2.5.15.2	Elektrotransformation von <i>A. disciformis</i> An d48 nach Kashefi & Hartzell (1995)	63
2.5.16	Generierung einer <i>HimarI</i> vermittelten Transposon-Mutantenbank von <i>A. disciformis</i> An d48 durch Elektrotransformation	64
2.5.17	„Transposon-recovery“	65
2.5.18	<i>In vivo</i> Transposition mit EZ::TN TM <KAN-2> Tnp Transposome TM Kit	67
2.5.19	<i>In vitro</i> Transposition mit GPS-1 Genome Priming System	67
2.5.20	Sequenzierung von DNA	68
2.5.21	Auswertung von DNA-Sequenzen	68
2.5.22	Methoden zur Analytik von Sekundärmetaboliten	69
2.5.22.1	Chemischer Nachweis von Sekundärmetaboliten durch HPLC-Analyse	69
2.5.22.2	Biologischer Assay zum Nachweis von Tubulysin (Cytotoxizitätstest)	70
3	ERGEBNISSE	72
3.1	Versuch der Identifizierung des Tubulysin-Biosynthese-genclusters in <i>S. erecta</i> Pd e68	72
3.1.1	Erstellen einer Cosmid-Genbank aus <i>S. erecta</i> Pd e68 und Hybridisierung mit homologen Sonden	73
3.1.2	Transformationsversuche von <i>Stigmatella erecta</i> Pd e68 mittels Elektroporation	75
3.2	Untersuchung alternativer Tubulysin-Produzenten	76
3.2.1	Bestimmung der Transformationseffizienz verschiedener Myxobakterien mittels Transposonmutagenese	78
3.2.1.1	Transformation von <i>A. disciformis</i> An d48 und <i>C. ferrogeneus</i> Cb fe22 mit dem „EZ::TN TM <KAN-2>Tnp Transposome TM Kit“	78
3.2.1.2	Transformation von <i>A. disciformis</i> An d48 und <i>C. ferrogeneus</i> Cb fe22 mit dem Plasmid pMycoMar	79
3.3	Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus <i>A. disciformis</i> An d48	81

3.3.1	Erzeugung einer Transposon-Mutantenbank aus <i>A. disciformis</i> An d48 unter Verwendung des <i>Himar1</i> abgeleiteten Mini-Transposons <i>magellan4</i>	81
3.3.2	Identifizierung von Tubulysin negativen Mutanten mittels Cytotoxizitätstest	83
3.3.3	„Transposon-recovery“ und Sequenzanalyse der verschiedenen Mutanten	84
3.3.4	Identifizierung von Strukturgenen des Tubulysin-Biosynthese-genclusters	86
3.3.5	Insertionsinaktivierung der Tubulysin-Biosynthese durch homologe Rekombination	87
3.3.6	Klonierung und Sequenzierung des gesamten Tubulysin-Biosynthese-genclusters	89
3.3.7	Analyse des Tubulysin-Biosynthese-genclusters	91
3.3.8	Definition der Tubulysin-Strukturgene	93
3.3.9	Identifizierung der Anschluss-Sequenz des Tubulysin-Biosynthese-genclusters	96
3.3.9.1	Southern Blot Analyse der Cosmide F7 und F13	97
3.3.9.2	Klonierung und Sequenzierung der Tubulysin-Gencluster Anschluss-sequenz aus dem Cosmid F7	98
3.3.9.3	Analyse der Anschluss-Sequenz des Tubulysin-Biosynthese-genclusters	99
3.3.10	Analyse der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Domänen	102
3.3.10.1	Analyse der Kondensationsdomänen	102
3.3.10.2	Analyse der Adenylierungsdomänen	103
3.3.10.3	Analyse der Peptidyl- bzw. Acyl Carrier Protein Domänen	106
3.3.10.4	Analyse der N- und C-Methyltransferase Domänen	106
3.3.10.5	Analyse der Heterozyklisierungsdomäne	108
3.3.10.6	Analyse der Oxidationsdomäne	109
3.3.10.7	Analyse der β -Ketoacylsynthase Domänen	110
3.3.10.8	Analyse der Acyltransferase Domänen	111
3.3.10.9	Analyse der β -Ketoacylreduktase Domänen	112
3.3.10.10	Analyse der β -Hydroxy-Dehydratase Domäne	113
3.3.10.11	Analyse der Enoylreduktase Domänen	113
3.3.10.12	Analyse der Thioesterase Domäne	114
3.4	Gezielte Inaktivierung von Genen aus dem Tubulysin-Biosynthese-gencluster durch homologe Rekombination	115
3.4.1	Inaktivierung von <i>tubZ</i>	115
3.4.1.1	Erzeugung der <i>tubZ</i> -Mutante	115
3.4.2	Inaktivierung von <i>orf2</i>	117
3.4.2.1	Generierung der <i>orf2</i> -Mutante	117
3.4.3	Inaktivierung von <i>tubG</i>	119

3.4.3.1	Erzeugung der <i>tubG</i> -Mutante	119
3.5	Versuche zur Optimierung der Elektrotransformation von <i>A. disciformis</i> An d48	121
3.6	Identifizierung und Charakterisierung von Struktur- und Regulationsgenen, deren Genprodukte an der Bildung von Sekundärmetaboliten in <i>A. disciformis</i> An d48 beteiligt sind	122
3.6.1	HPLC-Analyse der Transposon-Mutantenbank aus <i>A. disciformis</i> An d48	123
3.6.2	„Transposon-recovery“ und Sequenzanalyse der Mutanten	124
3.6.3	Kinetiken der Myxothiazol Produktion in den verschiedenen Überproduzenten	126
3.6.4	Untersuchung der Gensequenzen in den Myxothiazol-Überproduzenten durch Primer-walking	129
4	DISKUSSION	131
4.1	Versuch der Identifizierung des Tubulysin-Biosynthese-genclusters in <i>Stigmatella erecta</i> Pd e68	132
4.1.1	Hybridisierung der Cosmidbank aus <i>S. erecta</i> Pd e68 zur Auffindung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters	133
4.1.2	Versuche zur Erzeugung einer nicht Tubulysin produzierenden Mutante von <i>S. erecta</i> Pd e68	134
4.2	Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus <i>A. disciformis</i> An d48	136
4.2.1	Erstellen einer Transposon-Mutantenbank unter Verwendung des <i>HimarI</i> abgeleiteten Minitransposon <i>magellan4</i>	136
4.2.2	Identifizierung von Tubulysin negativen Mutanten mittels Cytotoxizitätstest	137
4.2.3	Genotypische Analyse der Tubulysin negativen Mutanten	138
4.3	Modell der Tubulysin-Biosynthese	139
4.4	Optimierungsversuche zur Elektrotransformation von <i>A. disciformis</i> An d48	146
4.5	Geninaktivierungsexperimente im Tubulysin-Biosynthesegencluster durch homologe Rekombination	148
4.6	Identifizierung und Charakterisierung von Struktur- und Regulationsgenen, deren Genprodukte an der Bildung von Sekundärmetaboliten aus <i>A. disciformis</i> An d48 beteiligt sind	151

4.6.1	Myxothiazol und Angiolam negative Mutanten aus <i>A. disciformis</i> An d48	151
4.6.2	Regulatoren der Myxothiazol-Biosynthese in <i>A. disciformis</i> An d48	152
5	ZUSAMMENFASSUNG	158
6	ANHANG	160
7	LITERATUR	161

Abbildungen

Abb. 1: Myxobakterielle und andere Toxine mit Wirkung auf das Aktin-Filament.	4
Abb. 2: Myxobakterielle und andere Toxine mit Wirkung auf das Mikrotubuli-Netzwerk.	6
Abb. 3: Posttranslationale Aktivierung des Multienzymkomplexes durch Übertragung eines Phosphopantetheinylrest auf die ACP-Domänen.	8
Abb. 4: Reaktionsabfolge der Polyketidbiosynthese.	9
Abb. 5: Optionale Domänen von Polyketidsynthasen.	10
Abb. 6: Reaktionsabfolge bei der nichtribosomalen Peptidbiosynthese.	12
Abb. 7: Optionale Domänen von nichtribosomalen Peptidsynthetasen.	13
Abb. 8: Inkubation von PtK ₂ -Zellen mit Tubulysin A über 24 Stunden.	14
Abb. 9: Chemische Struktur der Tubulysine.	15
Abb. 10: Schema zur Generierung, Kultivierung und Analyse der Transposon-Mutantenbank.	82
Abb. 11: Cytotoxizitätstest der Transposon-Mutanten von <i>A. disciformis</i> An d48.	84
Abb. 12: Abfolge der offenen Leserahmen auf dem Plasmid pMutT794/NotI.	87
Abb. 13: Allgemeines Schema für eine Insertionsinaktivierung durch einfache homologe Rekombination.	88
Abb. 14: PCR- und Restriktionsanalyse der Anschluß-Cosmide F5–F16.	90
Abb. 15: Alignment des bekannten Anteils des Tubulysin-Genclusters mit der Sequenz von Cosmid F11.	92
Abb. 16: Genanordnung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters.	93
Abb. 17: Vergleich der Tubulysin-Struktur mit der hypothetischen Tubulysin-Grundstruktur, die vermutlich synthetisiert wird.	96
Abb. 18: Southern-Blot Analyse der Cosmide F7 und F11.	98
Abb. 19: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten C-Domänen.	102
Abb. 20: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten A-Domänen.	103
Abb. 21: Untersuchung der Substratspezifität der A-Domänen aus den verschiedenen TUBs.	105

Abb. 22: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten PCP und ACP-Domänen.	106
Abb. 23: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen.	107
Abb. 24: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Heterozyklisierungsdomäne.	108
Abb. 25: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Oxidationsdomäne.	109
Abb. 26: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Ketoacylsynthase Domänen.	110
Abb. 27: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Acyltransferase Domänen.	111
Abb. 28: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Ketoacylreduktase Domänen.	112
Abb. 29: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Hydroxy-Dehydratase Domänen.	113
Abb. 30: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Enoylreduktase Domänen.	114
Abb. 31: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Thioesterase Domäne.	114
Abb. 32: Southern-Blot Analyse zur ortsspezifischen Integration von pTubZ-B.	116
Abb. 33: Southern-Blot Analyse zur ortsspezifischen Integration von pOrf2-B.	118
Abb. 34: Strategie zur Insertionsinaktivierung von <i>tubG</i> . Das zusätzliche Nucleotid im Primer AT _{up}	120
Abb. 35: Sequenzanalyse von <i>tubG</i> im Vergleich zwischen Wildtypen und der Mutante TGAS13.	121
Abb. 36: Beispiele für HPLC-Chromatogramme von Extrakten aus Klonen der Transposon-Mutantenbank von <i>A. disciformis</i> An d48 mit auffälligen Metabolitenspektren.	124
Abb. 37: Zeitkinetik der Myxothiazol-Produktion in den Überproduzenten verglichen mit dem Wildtypen von <i>A. disciformis</i> An d48.	127
Abb. 38: Kinetik zur Myxothiazol-Produktion in den Überproduzenten Mut348 und Mut422 im Vergleich zum <i>A. disciformis</i> An d48 Wildtypen. Dargestellt ist die ermittelte Myxothiazol-Konzentration aus Extrakten von 50 ml Kulturen (in mg/l) in Abhängigkeit zur Zeit.	128
Abb. 39: Frame-Plot Diagramm vom genomischen Sequenzbereich aus Mut348.	130

Abb. 40: Frame-Plot Diagramm vom genomischen Sequenzbereich aus Mut422.	130
Abb. 41: Elektronenmikroskopische Aufnahme von <i>S. erecta</i> Pd e68.	135
Abb. 42: Insertionsstellen des <i>magellan4</i> innerhalb des Tubulysin-Biosynthesegenclusters der verschiedenen nicht Tubulysin produzierenden Mutanten.	138
Abb. 43: Modell der Tubulysin-Biosynthese.	139
Abb. 44: Hypothese zur Umsetzung von L-Lysin zu Pipicolinsäure (Molnar <i>et al.</i> , 1996).	140
Abb. 45: Vergleich der Genotypen aus den Mutanten OS2AS3 bzw. OS2AS4 und TZAS1.	150
Abb. 46: Aufbau eines „einfachen“ Zwei-Komponenten-Systems.	154

Tabellen

Tab. 2.1.1: Versuchsspezifische Chemikalien und ihre Bezugsquellen.	18
Tab. 2.1.2: Verwendete Enzyme und Kits mit Angaben der jeweiligen Hersteller.	19
Tab. 2.1.3: Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.	20
Tab. 2.1.4: Medien für die Kultivierung von <i>E. coli</i> Stämmen.	23
Tab. 2.1.5: Kulturmedien und andere Substanzen zur Anzucht von Myxobakterien.	23
Tab. 2.1.6: Verwendete Antibiotika.	24
Tab. 2.2.1: Übersicht aller verwendeten Mikroorganismen.	24
Tab. 2.3.1: Verwendete Ausgangs-Plasmide.	25
Tab. 2.3.2: Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters generiert wurden.	26
Tab. 2.3.3: Plasmide, die Strukturgene bzw. regulatorische Gene tragen.	28
Tab. 2.3.4: Primer, die zu Aufklärung der Sequenz des Tubulysin-Biosynthesegenclusters abgeleitet wurden.	30
Tab. 2.3.5: Oligonucleotide für die Charakterisierung verschiedener Transposon-Mutanten von <i>A. disciformis</i> An d48.	32
Tab. 2.5.1: Gradientenparameter eines HPLC-Laufes-Trennsystem 1 für die HPLC-Analyse.	70
Tab. 2.5.2: Gradientenparameter eines HPLC-Laufes - Trennsystem 2 für die HPLC-Analyse.	70
Tab. 3.1.1: Sequenzhomologien der klonierten PKS- und NRPS-Fragmente.	73
Tab. 3.2.1: Plattierungskontrolle alternativer Tubulysin-Produzenten.	77
Tab. 3.2.2: Transformationseffizienzen verschiedener Myxobakterien mit dem <i>Himar1</i> abgeleiteten Mini-Transposon <i>magellan4</i> .	80
Tab. 3.3.1: Sequenzhomologien der abgeleiteten Aminosäuresequenz der DNA-Inserts aus den erzeugten „Transposon-Plasmiden“ der verschiedenen Tubulysin Knockout-Mutanten.	85
Tab. 3.3.2: PCR-Analyse der Anschluß-Cosmide.	91
Tab. 3.3.3: Die abgeleiteten Funktionen der im Tubulysin-Biosynthesegencluster kodierten Proteine.	95
Tab. 3.3.4: Sequenzauswertung der flankierenden Bereiche des Tubulysin-Biosynthesegenclusters.	100

Tab. 3.3.5: Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren aus den A-Domänen der verschiedenen Tubulysinsynthetasen (TUBs).	104
Tab. 3.6.1: Sequenzanalysen der verschiedenen Insertionsbereiche in den Transposon- Mutanten.	126

Abkürzungsverzeichnis

A-Domäne	Adenylierungsdomäne
ACP-Domäne Acyl	Acyl Carrier Protein Domäne
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
Amp	Ampicilin
AT-Domäne	Acyltransferase-Domäne
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
c	Konzentration
C	Kohlenstoff
ca.	circa
C-Domäne	Kondensationsdomäne
CIP	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (calf intestinal alkaline phosphatase)
C-MT	C-Methyltransferase-Domäne
CoA	Coenzym A
d	desoxy
Da	Dalton
DAD-HPLC	Dioden Array Detection gekoppelte HPLC
DAPI	4'-6-Diamino-2-Phenylindol
DH-Domäne	β -Hydroxy-Dehydratase-Domäne
DIG	Digoxigenin-11-dUTP
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dUTP	2'-Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure
ER-Domäne	Epimerisierungsdomäne

Fa.	Firma
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
F-Aktin	filamentöses Aktin
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GBF	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung
h	Stunde
HC-Domäne	Heterozyklisierungsdomäne
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobase
KR-Domäne	β -Ketoacylreduktase-Domäne
KS-Domäne	β -Ketoacylsynthase-Domäne
kV	Kilovolt
l	Liter
lacI	lac-Repressor
lacZ	lac-Galaktosidasegen
LB-Medium	Luria Bertani Medium
M	Molar
Mbp	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOX-Domäne	Monooxygenase-Domäne
msec	Millisekunden
MS	Massenspektroskopie
NADPH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid-phosphat
N-MT-Domäne	N-Methyltransferase-Domäne

NRP	nichtribosomales Peptid
NRPS	nichtribosomales Peptidsynthetase
NRPSs	nichtribosomales Peptidsynthetasen
OD	optische Dichte
O-MT-Domäne	O-Methyltransferase-Domäne
ORF	offener Leserahmen (open reading frame)
ORFs	offene Leserahmen (open reading frames)
Ox-Domäne	Oxidationsdomäne
PCP-Domäne	Peptidyl Carrier Protein Domäne
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pfu	Pyrococcus furiosus
PK	Polyketid
PKS	Polyketidsyntase
PKSs	Polyketidsyntasen
PP _i	Pyrophosphat (anorganisches Diphosphat)
pmol	pikomolar
Ppant	Phosphopantetheinrest
RBS	Ribosomenbindestelle
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
S	Spacer-Region
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SAP	alkalische Shrimp Phosphatase (shrimp alkaline phosphatase)
sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris/HCl-EDTA
TE-Domäne	Thioesterase-Domäne
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-aminomethan

TUBs	Tubulysinsynthetasen
U	Enzymeinheit (Unit)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-Galaktosid
°C	Grad Celsius
μ	Mikro

1 Einleitung

1.1 Myxobakterien

Mikroorganismen produzieren eine große Vielfalt an Naturstoffen, die verschiedenste biologische Aktivitäten aufzeigen. In letzter Zeit gewinnen dabei immer mehr die unterschiedlichen Gattungen der Ordnung *Myxococcales* an Bedeutung, da sie ein enormes biosynthetisches Potential aufweisen.

Die Ordnung *Myxococcales*, die sich in die Unterordnungen der *Cystobacterineae* und *Sorangineae* aufteilt, gehört zur δ -Gruppe der Proteobakterien. Insgesamt sind 7 Gattungen aus der Unterordnung *Cystobacterineae* und 5 Gattungen aus der Unterordnung *Sorangineae* bekannt. Myxobakterien sind obligat aerobe, chemotrophe, gram-negative Bodenbakterien. Durch ihre Vielfältigkeit treten sie ubiquitär auf, obwohl sie häufiger in warmen, semiariden Gebieten aufzufinden sind (z.B. Ägypten, Indien). Es sind stäbchenförmige Zellen, deren Länge von 4-12 μm und Breite von 0,7-1,2 μm variiert.

Eine besondere Eigenschaft der Myxobakterien ist ihre Fähigkeit, sich auf Oberflächen gleitend fortzubewegen. Dabei bewegen sie sich am Rand der Kolonie und breiten sich kreisförmig aus. Während dieser schwärmenden Bewegung hinterlassen sie einen dünnen Schleimfilm mit typischen Wellenmuster (Dawid, 1979). Aufgrund der Möglichkeit einer gerichteten Bewegung weisen sich die Myxobakterien zusätzlich durch ein einmalig ausgeprägtes „soziales Verhalten“ aus. Bei Nährstoffmangel können diese Bakterien über die hinterlassenen Schleimspuren aufeinander zuwandern und Fruchtkörper bilden (Shimkets, 1990; Reichenbach, 1986). Bei diesen Aggregaten handelt es sich um sehr unterschiedliche, komplexe Strukturen, an deren Ausbildung mehr als 10^9 Zellen beteiligt sein können und die bereits mit dem bloßen Auge zu erkennen sind. Ein Teil der Zellen differenziert sich in den gebildeten Fruchtkörpern zu Myxosporen. In diesem vegetativen Ruhezustand sind die Zellen in der Lage mehrere Jahre zu überdauern und unter günstigeren Umweltbedingungen wieder auszukeimen.

Die Vielfaltigkeit der art- bzw. gattungsspezifischen Fruchtkörperformen sind wichtige Bestimmungsmerkmale für die systematische Eingliederung der Myxobakterien. Diese reichen von einfachen kugelförmigen Aggregaten (*Myxococcus xanthus*, *Angiococcus disciformis*) bis zu palmenförmigen Strukturen (*Stigmatella aurantiaca*, *Chondromyces apiculatus*).

Alle Gattungen der Unterordnung *Cystobacterineae* besitzen einen bakteriolytischen Stoffwechsel. Durch das Ausscheiden von Exoenzymen sind Bakterien in der Lage, Proteine, Nucleinsäuren und Fette abzubauen. Diesem Stoffwechseltyp gehören auch die meisten Gattungen der Unterordnung *Sorangineae* an. Einen Einzelfall stellt die Gattung *Sorangium* dar, deren Vertreter in der Lage sind, Cellulose abzubauen. Auf diese Weise sind diese Bakterien in der Lage, ihren Kohlenstoffbedarf mittels diesem Abbauweg zu decken (Reichenbach, 1984).

Eine weitere Besonderheit der Myxobakterien stellt die Größe des Genoms dar, da die Zahl der kodierenden Gene eher denen einfacher Eukaryonten gleicht. Mit einem Gesamtumfang von ca. 9-12 Mbp besitzen sie die größten bekannten bakteriellen Genome (Pradella *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1990). Im Vergleich dazu besitzt *Escherichia coli* nur eine Genomgröße von 4,7 Mbp und die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt als Eukaryont ein Gesamtgenom von 14 Mbp. Des weiteren zeichnet sich das Genom der Myxobakterien durch einen sehr hohen GC-Gehalt von 66-72% aus (Mandel & Leadbetter, 1965).

1.2 Sekundärmetabolite aus Myxobakterien

Myxobakterien produzieren eine große Anzahl strukturell verschiedener, biologisch aktiver Naturstoffe. In den letzten 25 Jahren wurden durch intensive Forschungen in der Abteilung Naturstoffe der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) Braunschweig über 100 verschiedene Sekundärmetabolite identifiziert und überdies hinaus davon weitere 500 Strukturderivate. Viele dieser Substanzen (40%) waren vorher völlig unbekannt und andere zeigten lediglich Übereinstimmungen in strukturellen Komponenten zu bereits bekannten Stoffen, z.B. aus Streptomyceten (Gerth *et al.*, 2003; Reichenbach, 1999/2000). Die myxobakteriellen Naturstoffe gehören den

verschiedensten chemischen Verbindungsklassen an. So wurden Polyether, Polyene, Makrolide, Peptide, Peptolide, Terpene und weitere identifiziert. Sogar Steroide werden synthetisiert, was in prokaryontischen Organismen extrem selten vorkommt (Bode *et al.*, 2003; Reichenbach, 2001). Durch die große Strukturvielfalt der Naturstoffe besteht ebenfalls ein weit gefächertes Wirkungsspektrum. Es gibt Inhibitoren der prokaryontischen- (z. B. Myxovalargin; (Irschik *et al.*, 1983)) wie auch der eukaryontischen-ribosomalen Proteinbiosynthese (z.B. Gephyronsäure; (Sasse, 1995)). Soraphen ist ein Hemmstoff der pilzlichen Acetyl-CoA-Carboxylase (Vahlensieck *et al.*, 1994) und wiederum andere Substanzen blockieren die eubakterielle RNA-Polymerase (z.B. Sorangicin). Die Mitglieder einer weiteren Stoffgruppe dienen als Inhibitoren der Atmungskette. Dabei unterscheiden sie sich in ihrem Angriffspunkt in der Respirationskette. Myxalamid z.B. blockiert die NADH:Ubichinon Oxidoreduktase des Komplex I (Gerth *et al.*, 1983), wogegen Stigmatellin (Kunze *et al.*, 1984) und Myxothiazol (Thierbach & Reichenbach, 1981) den *bc₁*-Komplex (KomplexIII) blockieren. Des weiteren wird eine Reihe von Stoffen gebildet, die auf das Cytoskelett eukaryontischer Zellen wirken und somit als Leitsubstanz für die Entwicklung von Cytostatika dienen können.

1.3 Potentielle Cytostatika aus Myxobakterien

Ein entscheidender Grund für das wachsende Interesse an den Myxobakterien liegt in der Produktion von Sekundärmetaboliten mit hoher cytostatischer bzw. antimitotischer Wirkung. Es konnten Naturstoffe aus Myxobakterien identifiziert werden, die toxisch auf verschiedene Bestandteile des eukaryotischen Cytoskeletts wirken. Cytostatika mit solch einer Wirkung wurden bisher nur aus Pflanzen, Pilzen, Cyanobakterien und Schwämmen isoliert. So wirken Rhizopodin aus *Myxococcus stipitatus* (Sasse *et al.*, 1993) und Chondramid A aus *Chondromyces crocatus* (Sasse *et al.*, 1998) auf die Aktin-Filamente der Zellen (s. Abb. 1). Die Inkubation von eukaryontischen Zellen mit Rhizopodin führt zu einer Destabilisierung und Reorganisation der Aktin-Filamente. Im Gegensatz dazu induziert Chondramid A die Polymerisation von G-Aktin (globuläres Aktin) und stabilisiert die Mikrofilamente. In beiden Fällen kommt es nach Inkubation

zu einem Zusammenbruch der intrazellulären Vorgänge, die von der Dynamik des Aktin-Filaments (Tretmühl-Mechanismus) abhängig sind. Ebenfalls kann die Cytokinese am Ende einer Zellteilung nicht mehr vollzogen werden. Die Mitose bricht zu diesem Zeitpunkt ab und es entstehen vergrößerte, mehrkernige Zellen, die nach einer gewissen Zeit absterben (Gronewold *et al.*, 1999).

Bekannte Stoffe, die solche Wirkungen auf die Aktin-Filamente eukaryontischer Zellen haben, sind z.B. das Pilz-Alkaloid Cytochalasin B und das bitykliche Heptapeptid Phalloidin aus dem Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*). Bei diesen Toxinen kommt es durch eine Bindung an das F-Aktin (filamentöses Aktin) zu Destabilisierung und Abbau der Aktin-Filamente bzw. durch Bindung an die G-Aktine zur Förderung der Stabilisierung.

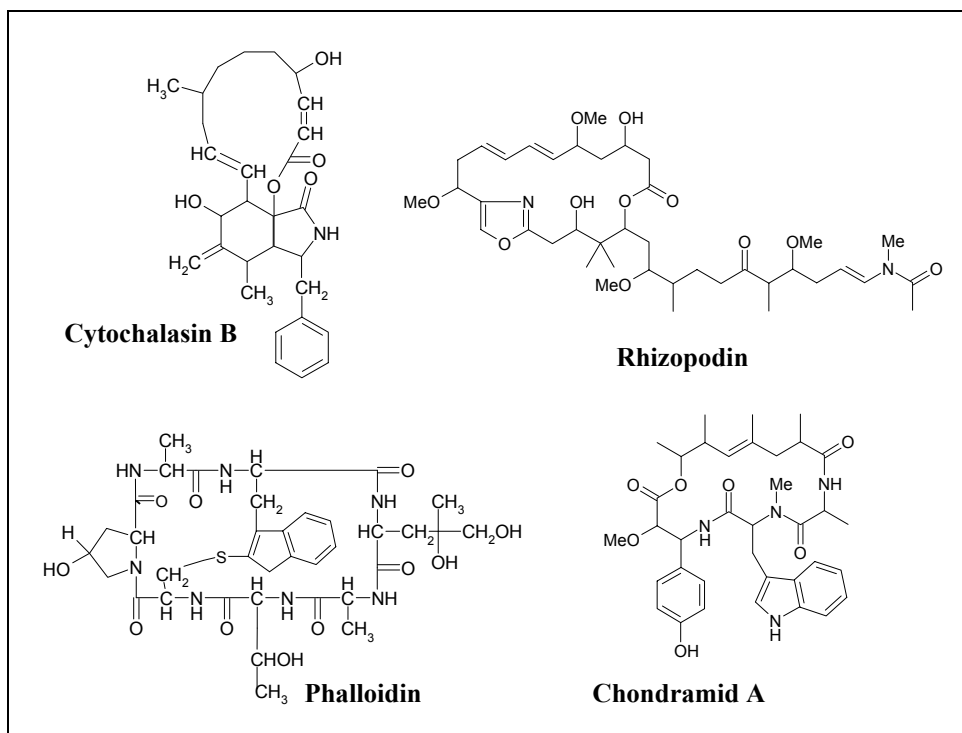


Abb. 1: Myxobakterielle und andere Toxine mit Wirkung auf das Aktin-Filament. Auf der linken Seite sind bekannte Zellgifte aus eukaryontischen Organismen gezeigt und auf der rechten Seite solche aus Myxobakterien.

Eine andere Naturstoffgruppe wirkt auf das Mikrotubuli-Netzwerk eukaryontischer Zellen. Mikrotubuli sind steife Polymere aus Tubulin-Molekülen, die wiederum aus einem Heterodimer von α/β -Tubulin-Einheiten aufgebaut sind. Wie beim Aktin ist auch

beim Tubulin die Polymerisation ein dynamischer Vorgang (dynamische Instabilität), der durch die Hydrolyse eines fest gebundenen Nucleotids (GTP) gesteuert wird. Es sind keine statischen Strukturen, sondern dynamische Polymere, die in der Zelle für die verschiedensten Funktionen verantwortlich sind. Als Bestandteil des Cytoskeletts sind sie Teil der formgebenden Strukturen in der Zelle. Als Komponenten von Cilien und Geißeln haben sie eine zentrale Aufgabe bei der Bewegung von Zellen. Mikrotubuli haben für den intrazellulären Transport die Aufgabe von Transportbahnen, an denen Vesikel und Organellen mit Hilfe von Motorproteinen transportiert werden. Ihre dynamischen Eigenschaften werden weiter genutzt, um Zellsignale zu übertragen. Eine wichtige Aufgabe übernehmen die Mikrotubuli auch bei der Mitose bzw. Meiose.

Aufgrund der unterschiedlichen Wirkung der antimitotischen Naturstoffe auf das Mikrotubuli-Netzwerk können diese in zwei Gruppen unterteilt werden. Entweder stabilisieren sie die Mikrotubuli und induzieren die Polymerisation; andernfalls destabilisieren sie diese und führen zum Abbau des Mikrotubuli-Netzwerks. Beide Wirkungen führen in den Zellen unweigerlich zum Zusammenbruch der Mikrotubuli-gesteuerten Zellvorgänge und induzieren schließlich den programmierten Zelltod (Apoptose). Der wohl bekannteste Vertreter dieser antimitotischen Zellgifte ist das Epothilon (Bollag *et al.*, 1995). Dieses wurde aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert und hat einen ähnlichen Wirkungsmechanismus wie das bekannte Taxol. Durch die Stabilisierung der Mikrotubuli verlieren diese ihre Dynamik. Ein Maß für die Wirkung der Cytotoxine ist der IC_{50} -Wert. Dieser Wert gibt die Konzentration an, die bei Inkubation mit verschiedenen Krebszelllinien in 50% der Zellen zur Hemmung der Zellproliferation führt. Die Epothilone (IC_{50} 0,002 μM) sind in ihrer Wirkung wesentlich stärker als Taxol (IC_{50} 4,14 μM) und induzieren zusätzlich den Zelltod in Taxol-resistenten Krebszelllinien.

Eine weitere Substanz ist das Tubulysin (Sasse *et al.*, 2000), dessen Biosynthese und deren Regulation Thema dieser Arbeit ist. Tubulysin wirkt destabilisierend auf das Mikrotubuli-Netzwerk eukaryontischer Zellen, genau wie die bekanntesten Vertreter dieser Wirkgruppe Colchicin (aus *Colchicum autumnale*), Dolastatin (aus *Dolabella auricularia*) und die Vinca-Alkaloide Vinblastin und Vincristin (aus *Catharanthus roseus*) (s. Abb. 2). Die Wirkung der Tubulysine ist dabei so effektiv,

dass *in vivo* weder Taxol noch Epothilon die Depolymerisation der Zellmikrotubuli durch Tubulysin verhindern können (Khalil, 1999).

Vor Kurzem wurde eine dritte antimittotisch wirkende Substanz aus Myxobakterien charakterisiert, die ebenfalls zur vollständigen Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerks in eukaryontischen Zellen führt (Elnakady *et al.*, 2004). Bei dieser Substanz handelt es sich um das Disorazol A₁, welches aus *Sorangium cellulosum*, Stamm So ce12 isoliert wurde.

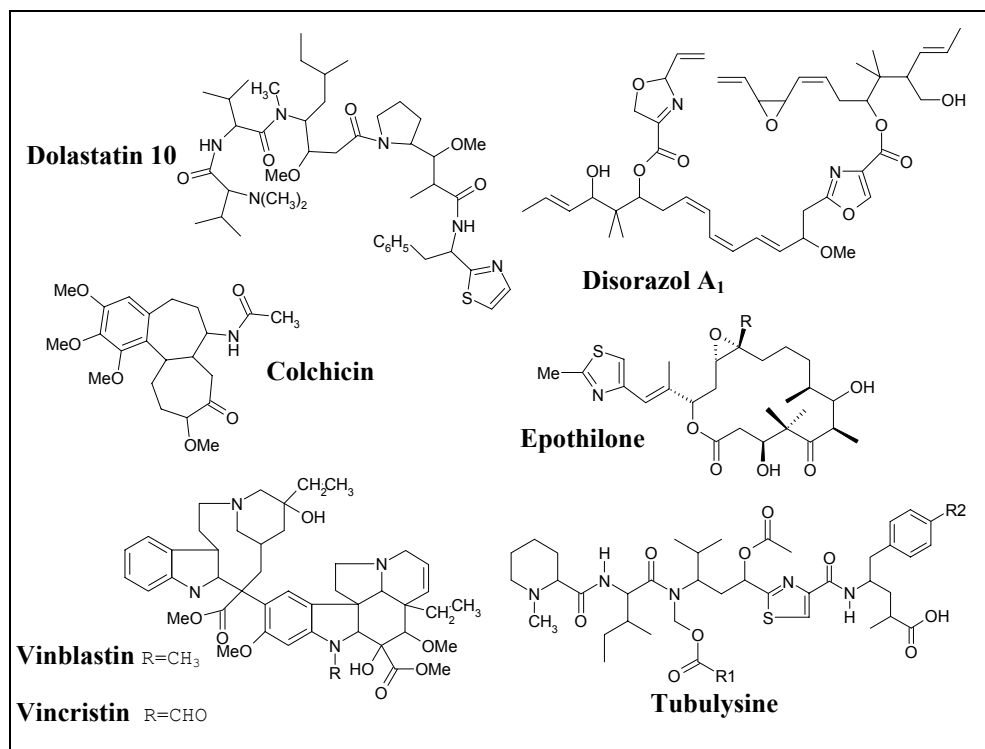


Abb. 2: Myxobakterielle und andere Toxine mit Wirkung auf das Mikrotubuli-Netzwerk. Auf der linken Seite sind bekannte Zellgifte aus eukaryontischen Organismen dargestellt und auf der rechten Seite diejenigen aus Myxobakterien.

1.4 Biosynthese von Naturstoffen durch Polyketidsynthasen und nichtribosomale Peptidsynthetasen

1.4.1 Funktionsweise von Polyketidsynthasen

Viele Sekundärmetabolite zeichnen sich durch ein niedermolekulares Polyketid- oder Polypeptid-Grundgerüst aus und werden von Polyketidsynthasen bzw. nichtribosomale Peptidsynthetasen gebildet. Die Synthese von Polyketiden erfolgt über einen katalytischen Weg, der mit der Fettsäurebiosynthese vergleichbar ist. Basierend auf dieser Katalyse und dem Proteinaufbau lassen sich die Polyketidsynthasen in die unterschiedlichen Typen I–III klassifizieren.

Polyketidsynthasen des Typs I sind multifunktionale Enzyme, die in Modulen organisiert sind (Hopwood, 1997). Jedes dieser Module enthält Kern- und eventuell optionale Domänen, die für einen vollständigen Zyklus zur katalytischen Verlängerung der wachsenden Molekülkette benötigt werden (s. Abb. 3). Die Gesamtheit dieser Module bzw. Polyketidsynthasen wird in der Regel von Genen kodiert, die innerhalb eines Genclusters organisiert sind. Die einzelnen Bausteine werden im Cytosol kovalent an spezifische Enzymabschnitte gebunden und dann sukzessive verknüpft. Bei der Kondensation von niedermolekularen Carbonsäuren zu einer wachsenden Kette wird jedes Modul nur einmal benutzt und reicht das entsprechende Intermediat an das nachfolgende Modul weiter. Aus diesem katalytischen Reaktionsweg resultiert die Kolinearität von Proteinmatrize und Produkt. Nach Einbau des letzten Monomers wird das lineare Intermediat durch Hydrolyse oder Zyklisierung vom Protein abgelöst. Diese Abspaltung wird von Thioesterase (TE) Domänen katalysiert.

Das wachsende Intermediat ist während der gesamten Biosynthese kovalent an den Multienzymkomplex gebunden. Diese Verknüpfung und die Übertragung von einem Modul zum nächsten wird durch eine Acyl Carrier Protein (ACP) Domäne reguliert. Eine analoge Regulation findet in nichtribosomalen Peptidsynthetasen durch eine Peptidyl Carrier Protein (PCP) Domäne statt. Diese Domänen müssen zu Beginn der Biosynthese posttranslational aktiviert werden, was durch eine Phosphopantetheinyltransferase katalysiert wird. Diese überträgt einen aus dem Coenzym A stammenden Phosphopantetheinrest auf ein hochkonserviertes Serin in der Domäne (Lambalot *et al.*,

1996). An die Sulfhydrylgruppe des Phosphopantetheinarmes werden die Kettenverlängerungseinheiten als Thioester gebunden. In der Modellvorstellung fungiert der Phosphopantetheinrest als schwingender Arm, der die Intermediate zum nächsten Modul weiterreicht.

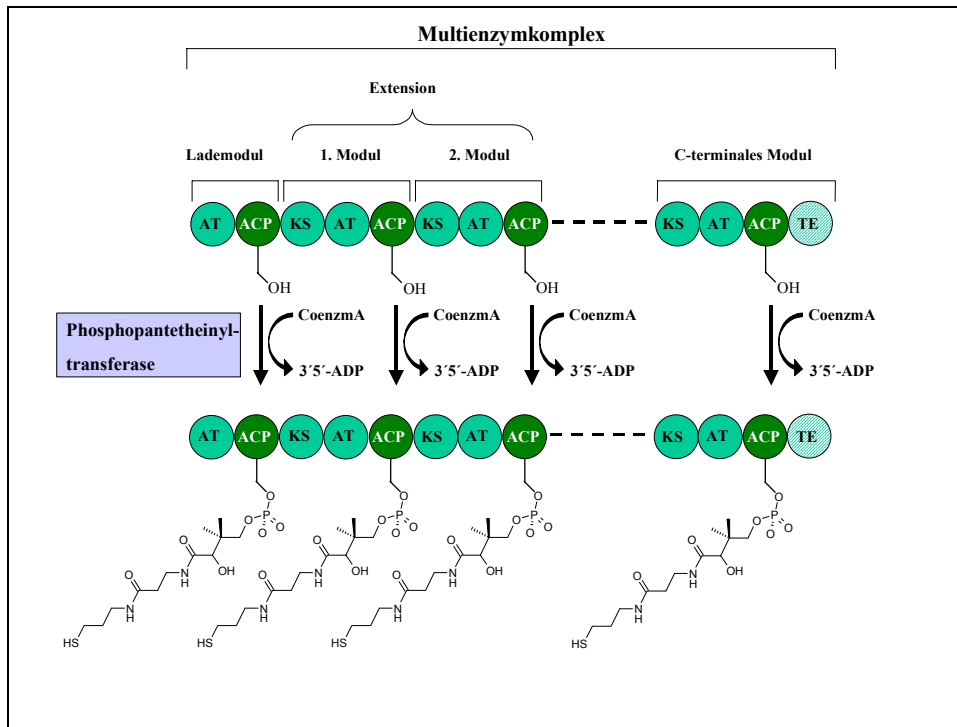


Abb. 3: Posttranslationale Aktivierung des Multienzymkomplexes durch Übertragung eines Phosphopantetheinylrest auf die ACP-Domänen. Durch eine Phosphopantetheinyltransferase wird ein aus dem Coenzym A stammender Phosphopantetheinrest auf ein konserviertes Serin in den ACP-Domänen übertragen. An die Sulfhydrylgruppe dieses „Armes“ werden die Carbonsäureeinheiten als Thioester gebunden.

Neben der ACP Domäne gehören zu der minimalen Ausstattung eines Moduls eine Acyltransferase (AT) und eine β -Ketoacylsynthase (KS) Domäne (s. Abb. 4) Diese drei Kerndomänen werden für die Verlängerung der wachsenden Ketidkette um einen Baustein benötigt. Im Gegensatz dazu besteht das Lademodul nur aus einer AT- und einer ACP-Domäne.

Die Biosynthese startet mit der substratspezifischen Beladung der Acyltransferase Domäne im ersten Modul (Lademodul). Als Substrat dienen dabei CoA-Thioester kurzkettiger Carbonsäuren (Acetyl-CoA oder Propionyl-CoA), die nach der Beladung mit dem Ketid auf den folgenden ACP-Domänen verknüpft werden. Die Acyltransferasen der Extensionsmodule beladen analog die ACP-Domäne des

jeweiligen Moduls mit Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA. Die β -Ketoacylsynthase Domänen sind schließlich für die Verknüpfung der einzelnen Carbonsäuren zuständig. Durch einen nucleophilen Angriff an der Startereinheit wird diese an ein hochkonserviertes Cystein der KS-Domäne des ersten Extensionsmoduls gebunden. Die Decarboxylierung der als Thioester gebundenen α -Dicarbonsäure-Verlängerungseinheit am ACP entsteht ein Carbanion, das die Startereinheit wiederum nucleophil angreift. Dadurch entsteht ein Diketid, das in der folgenden Kettenverlängerung dem nächsten Extensionsmodul als Donor dient. Diese Reaktionsabfolge wiederholt sich, bis das Polyketid fertiggestellt wurde und von der Thioesterase Domäne vom Enzymkomplex abgespalten wird.

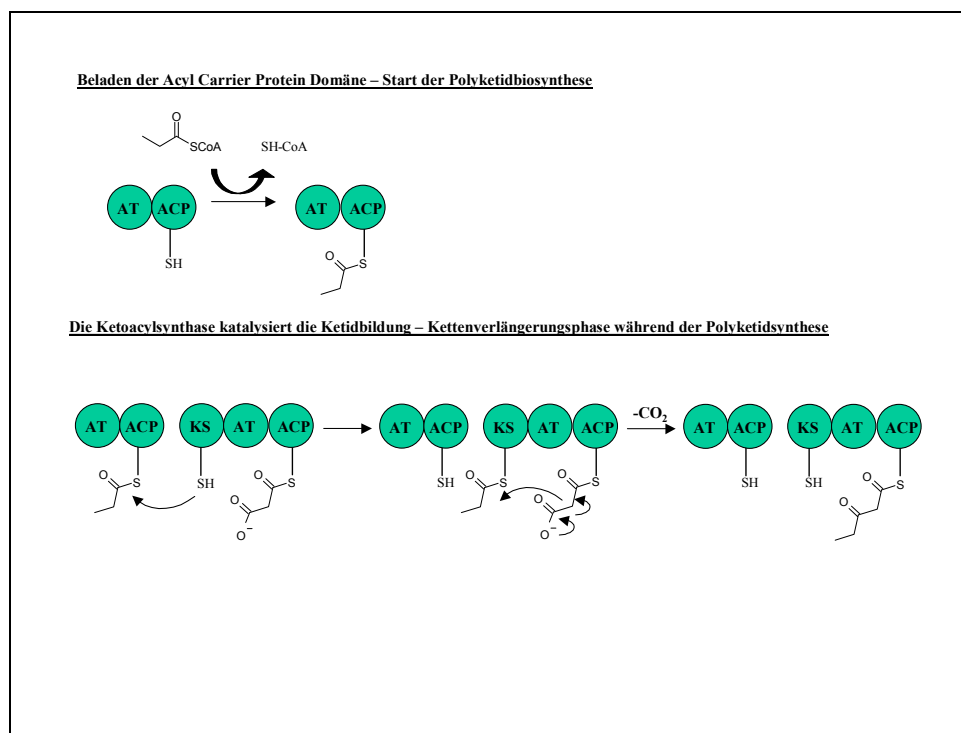


Abb. 4: Reaktionsabfolge der Polyketidbiosynthese.

Die entstandenen β -Carbonyl-Gruppen des Polyketids können durch optionale Domänen reduziert werden (s. Abb. 5). Diese optionalen Domänen befinden sich innerhalb des jeweiligen Moduls und bilden in dem Enzymkomplex eine „reduktive Schleife“ (Staunton & Weissman, 2001). So kann eine NADPH-abhängige β -Ketoacylreduktase (KR) Domäne den β -Carbonylkohlenstoff zum sekundären

Alkohol reduzieren. Durch eine β -Hydroxy-Dehydratase (DH) Domäne wird der Alkohol durch Wasserabspaltung zum Enoyl reduziert, das abschließend durch eine NADPH-abhängige Enoylreduktase (ER) Domäne zum Alkan reduziert werden kann. Im Gegensatz zur Fettsäurebiosynthese können im entstandenen Polyketid sämtliche Reduktionsstufen auftreten (Hopwood, 1997).

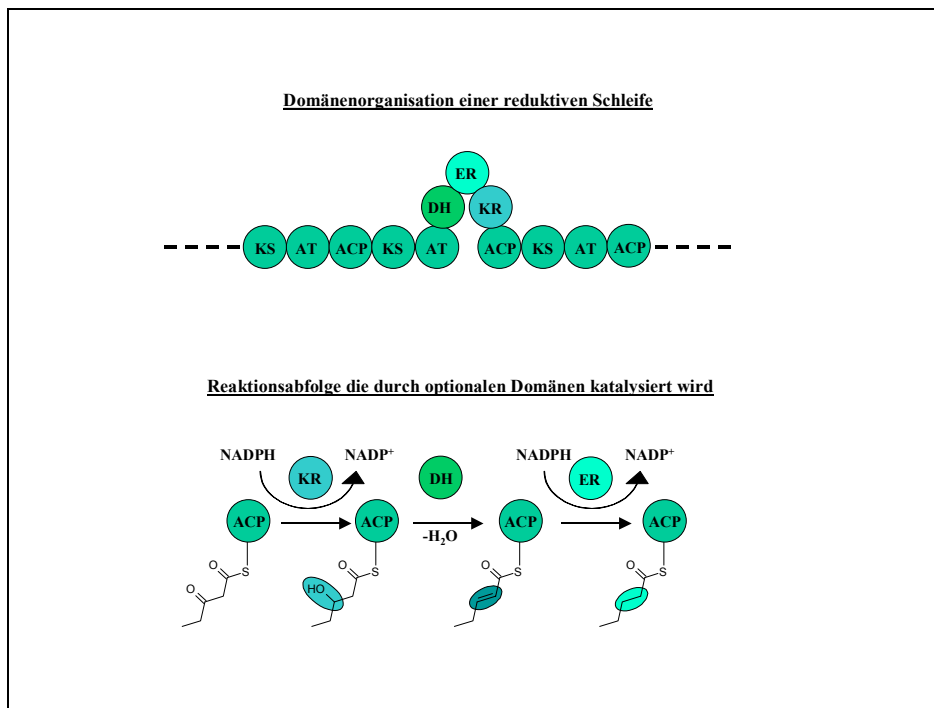


Abb. 5: Optionale Domänen von Polyketidsynthasen.

Neben den bakteriellen Polyketidsynthasen vom Typ I gibt es noch pilzliche Polyketidsynthasen des Typ I (Fujii, 1999). Diese unterscheiden sich in soweit von den bakteriellen, dass die Module iterativ genutzt werden (z.B. Lovastatin; (Hendrickson *et al.*, 1999)). Bei bakteriellen Polyketidsynthasen vom Typ II bilden die katalytischen Domänen separate Untereinheiten eines Multienzymkomplexes (Hopwood, 1997). Als Substrat wird ausschließlich Malonyl-CoA zur Kettenverlängerung verwendet. Durch zusätzliche modifizierende Enzyme entsteht die große Diversität dieser aromatischen, häufig polyzyklischen Polyketide (z.B. Tetracenomycin; (Hopwood, 1997)).

Zu den Polyketidsynthasen des Typs III gehören auch pflanzliche Chalconsynthasen (Moore & Höpke, 2001; Funa *et al.*, 1999). Von dieser Enzymklasse werden ebenfalls CoA-Einheiten durch eine decarboxylierende Kondensation verknüpft (Ferrer *et al.*,

1999). Im Gegensatz zu den anderen PKS Typen werden die Substrate und Intermediate nicht an Phosphopantetheinylreste gebunden.

1.4.2 Funktionsweise von nichtribosomalen Peptidsynthetasen

Nichtribosomale Peptidsynthetasen sind in ihrem Aufbau ähnlich wie Polyketidsynthetasen vom Typ I organisiert. Ebenso wie bei diesen besteht der multifunktionale Enzymkomplex aus aneinander gereihten Modulen, die für die Verlängerung des wachsenden Intermediats benötigt werden (Cane & Walsh, 1999; Keating & Walsh, 1999). Als Substrat werden bei nichtribosomalen Peptidsynthetasen proteinogene und nicht proteinogene Aminosäuren verwendet. Die minimale Domänen-Ausstattung eines Moduls besteht aus einer Adenylierungsdomäne (A), einer Kondensationsdomäne (C) und einer Peptidyl Carrier Protein (PCP) Domäne (s. Abb. 6). Wie bei den Polyketidsynthetasen besteht das Lademodul in der Regel nur aus einer A- und einer PCP-Domäne. Die A-Domäne eines jeden Moduls aktiviert die ihrer Substratspezifität entsprechende Aminosäure in einer ATP-abhängigen Reaktion zum Aminoacyladenylat und überträgt dieses auf die nachfolgende PCP-Domäne. Die Substratspezifität der A-Domänen wird von acht nicht konservierten Aminosäuren innerhalb ihrer hydrophoben Bindetasche bestimmt (Conti *et al.*, 1997). Durch den Vergleich von mehr als 150 verschiedenen A-Domänen konnte durch bioinformatische Studien ein Spezifitätscode bestimmt werden (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die C Domäne katalysiert den nukleophilen Angriff der Aminogruppe eines Aminoacylrestes auf den Carbonylkohlenstoff des am vorgelagerten Modul gebundenen Peptidyl- bzw. Aminoacylrestes, wodurch eine Peptidbindung entsteht. In Analogie zur PKS wird dieser Prozess wiederholt, bis das Polypeptid am letzten Modul seine volle Länge erreicht hat und von einer TE Domäne als lineares oder cyclisches Produkt vom Multienzymkomplex abgespalten wird (Marahiel *et al.*, 1999).

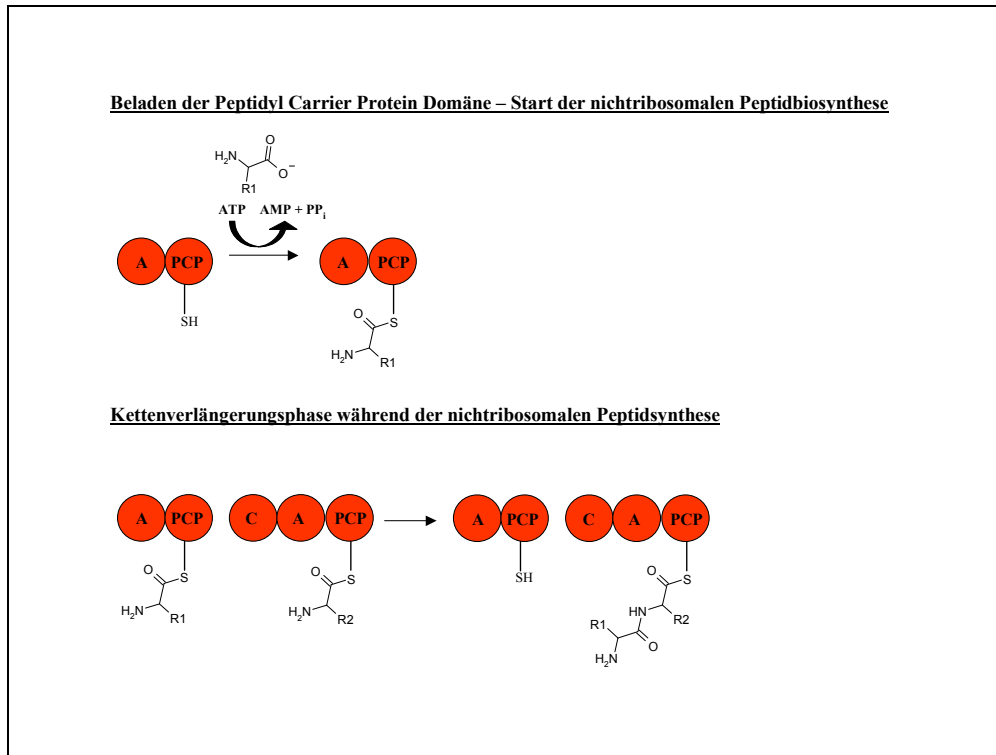


Abb. 6: Reaktionsabfolge bei der nichtribosomalen Peptidbiosynthese.

Optional können in den einzelnen Modulen modifizierende Domänen vorhanden sein, die zur Vielfaltigkeit der verschiedenen Polypeptide beitragen (s. Abb. 7). Zu diesen zählen Epimerisierungs (E) Domänen, Methyltransferase (MT) Domänen, F₄₂₀-abhängige Monooxygenase (Mox) Domänen, Heterozyklisierungs (HC) Domänen und Oxidations-(Ox)-Domänen. Die Funktion von Epimerisierungsdomänen ist L-Aminosäuren in ihre D-Form um zu wandeln. Methyltransferasen übertragen in einer S-Adenosyl-Methionin (SAM) abhängigen Reaktion eine Methylgruppe auf ein Kohlenstoff-, Sauerstoff- oder Stickstoffatom des Intermediats (bei NRPS nur N-MT-Domänen vorhanden). Die Inkorporation von Hydroxygruppen in das wachsende Intermediat wird durch F₄₂₀-abhängige Monooxygenasen katalysiert. Heterozyklisierungsdomänen sind spezielle Kondensationsdomänen, die neben der Bildung einer Peptidbindung eine Zyklisierung und Dehydratisierung der Aminosäuren Cystein, Serin oder Threonin katalysieren können. Dabei greift die Sulfhydrylgruppe im Falle von Cystein bzw. die Hydroxylgruppe im Falle von Serin oder Threonin den Carbonylkohlenstoff der Peptidbindung nukleophil an, so dass unter Wasserabspaltung ein Thiazolin- (nach Cystein-Einbau) oder ein Oxazolinring (nach Serin- bzw.

Threonin-Einbau) entsteht. Durch eine folgende Oxidationsdomäne können diese Heterozyklen zum Thiazol- bzw. Oxazolring weiteroxidiert werden.

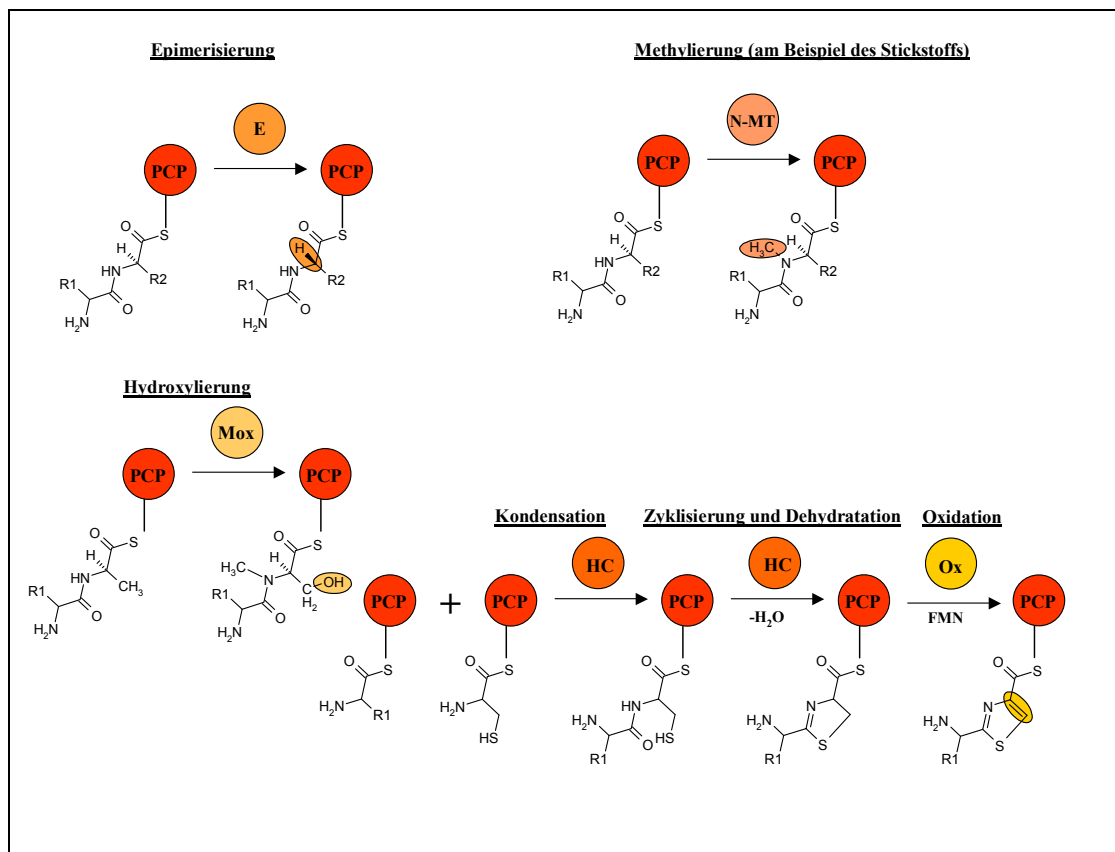


Abb. 7: Optionale Domänen von nichtribosomalen Peptidsynthetasen.

1.5 Tubulysin

Bei der Suche nach neuen, biologisch aktiven Metaboliten aus Myxobakterien wurden die Tubulysine zuerst in Kulturextrakten des Myxobakteriums *Archangium gephyra* Ar 315 identifiziert, die eine stark cytotoxische Wirkung auf L929 Maus-Fibroblasten zeigten (Sasse *et al.*, 2000). Später konnten weitere Tubulysine aus den Gattungen *Angiococcus*, *Stigmatella* und *Cystobacter* isoliert werden. Tubulysine zeigen keine Wirkungen auf Bakterien oder Hefen und sind nur gering aktiv gegen Pilze. Im Gegensatz dazu besitzen sie eine starke cytostatische Wirkung auf Zellen höherer Eukaryonten. Aufgrund dieser hohen Cytotoxizität, die gegen Säugerzellen im

pikomolaren Bereich liegt (IC_{50} 0,02-1 ng/ml), sind die Tubulysine von großem Interesse als mögliche Cytostatika in der Krebstherapie.

Eine Inkubation von PtK₂-Zellen (potoroo Kidney) mit 50 ng/ml Tubulysin A führt innerhalb von 24 Stunden zum völligen Abbau des Mikrotubuli-Netzwerks in diesen Zellen (s. Abb. 8). Nach einer Inkubation von 4 Stunden kann man erste morphologische Veränderungen in den Zellen erkennen. Die Mikrotubuli werden von der Peripherie ausgehend abgebaut. Die gesamte Organisation des Netzwerks erscheint diffuser und die Centrosomen kondensieren in der Nähe der Zellkerne. Nach 24 Stunden kommt es zu einer vollständigen Auflösung des Mikrotubuli-Netzwerks und der Centrosomen. Die Zellkerne beginnen zu fragmentieren, was ein Charakteristikum für eine ablaufende Apoptose ist. Eine zehnfach höhere Aktivität gegenüber Säugerzellen zeigt das Tubulysin D. Schon bei einer Inkubation der PtK₂-Zellen mit nur 0,5 ng/ml Tubulysin D kommt es in diesen Zellen zu einer multiplen Centrosomen-Bildung (Sasse *et al.*, 2000). Dies führt während der Mitose zu einer irreparablen Fehlverteilung des Chromosomensatzes auf die Tochterzellen. In höheren Konzentrationen ist die gleiche Wirkung auf PtK₂-Zellen wie bei Tubulysin A zu beobachten. Untersuchungen zur Bindung des Tubulysins an das Tubulin-Molekül zeigten, dass es wahrscheinlich die gleiche Bindestelle wie Vinblastin besitzt (Khalil, 1999).

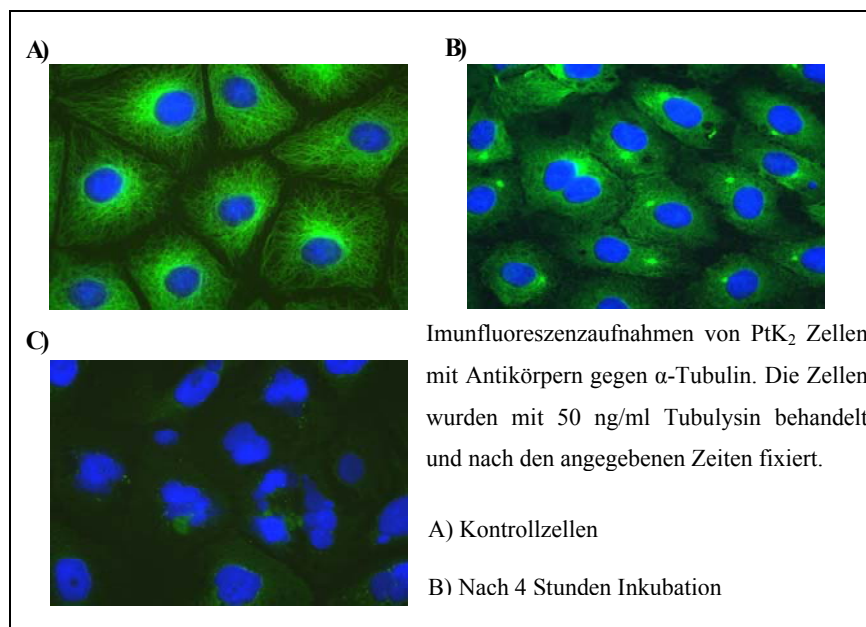


Abb. 8: Inkubation von PtK₂-Zellen mit Tubulysin A über 24 Stunden. Für die Visualisierung der Zellkerne wurden diese mit DAPI gefärbt. Die Fotos wurden von Dr. Sasse (GBF) zur Verfügung gestellt.

Die Struktur der Tubulysine wurde an der GBF aufgeklärt (Steinmetz, 2004) und ist in Abb. 9 zu sehen. Es handelt sich um ein Depsipeptid, das zum Teil ungewöhnliche Aminosäuren enthält. So ist eine N-Methyl-L-Pipecolinsäure über eine Peptidbindung kovalent an L-Isoleucin gebunden. Die weiteren Aminosäuren sind Valin, Cystein und Tyrosin (Tubulysin A und B) bzw. Phenylalanin (Tubulysin D und E). Vorhergehende Fütterungsversuche zeigten, dass die Methylgruppen an der L-Pipecolinsäure (Position 25) sowie am Valin (Pos. 39) und Tyrosin bzw. Phenylalanin (Pos. 26) aus Methionin stammen. Durch weitere Markierungsversuche konnten Kohlenstoffatome im Grundgerüst der Tubulysine identifiziert werden, die aus Acetateinheiten stammen (Pos. 10, 11 und 1, 2). Zusätzlich sind mit dem Tubulysin-molekül zwei Acylreste über Esterbindungen verknüpft. An der Position 11 ist dies Essigsäure und an Position 39 Isovaleriansäure (Tubulysine A und D) bzw. Buttersäure (Tubulysine B und E).

Die vier Tubulysine A, B, D und E waren die ersten, die in den verschiedenen Gattungen von *Archangium*, *Angiococcus*, *Stigmatella* und *Cystobacter* isoliert und charakterisiert wurden. Bis zur Erstellung dieser Arbeit wurden mehr als zehn weitere Tubulysine identifiziert. Die Isolierung dieser Tubulysine machte deutlich, dass bei der Acylierung an Position 39 weitaus mehr Acyldonatoren als Substrat erkannt und in das Tubulysinmolekül eingebaut werden (H. Steinmetz; persönliche Mitteilung).

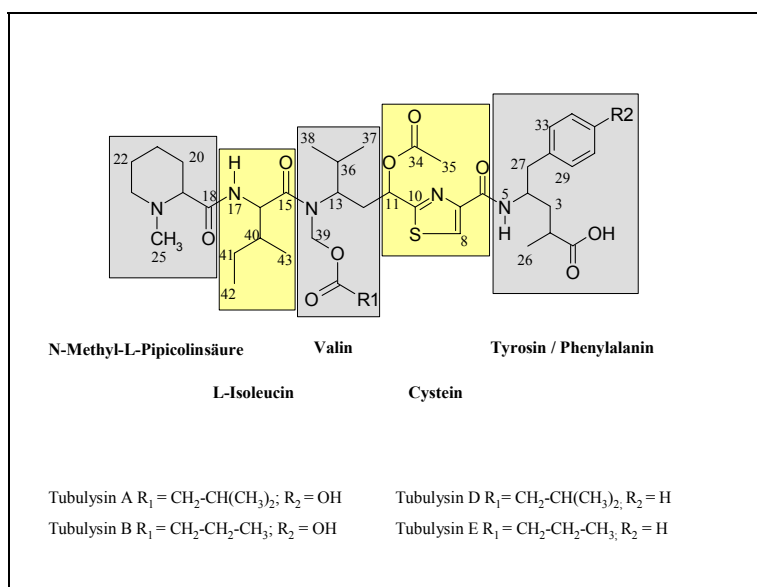


Abb. 9: Chemische Struktur der Tubulysine.

1.6 Hypothese zum Aufbau des Tubulysin-Biosynthese Genclusters

Aufgrund der chemischen Struktur von Tubulysin wurde zu Beginn dieser Arbeit ein Postulat für die Tubulysinbiosynthese aufgestellt. Das Depsipeptid Tubulysin sollte über einen Multienzymkomplex synthetisiert werden, der sowohl Polyketidsynthasen (PKS) als auch nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS) enthält. Kodiert wird dieser Enzymkomplex in einem gemischten PKS-/NRPS-Biosynthesegencluster. Diese Hypothese stützt sich darauf, dass es zur Bildung von Peptiden nur drei verschiedene Synthesewege gibt (Kleinkauf & von Döhren, 1997; Kleinkauf *et al.*, 1992). Neben der ubiquitären ribosomalen Synthese unter Verwendung der 20 verschiedenen proteinogenen Aminosäuren existieren zwei weitere enzymatische Synthesewege: Die Bildung von Di- oder Tripeptiden durch lösliche Enzyme sowie die Synthese von Oligopeptiden durch oben erwähnte Multienzymkomplexe. Da das Tubulysinmolekül ein Oligopeptid ist und zum Teil ungewöhnliche bzw. nicht proteinogene Aminosäuren enthält, erschien die Biosynthese durch einen Multienzymkomplex am wahrscheinlichsten.

Das Tubulysin-Biosynthesegencluster sollte aus vier NRPS- und zwei PKS-Extensionsmodulen aufgebaut sein. Beide PKS-Module sollten eine vollständige reduktive Schleife mit einer KR-, DH- und ER-Domäne enthalten (s. 1.4.1.). Zusätzlich zeichnet sich die Biosynthese des Grundgerüsts durch den Einbau einer N-Methyl-Pipecolinsäure als Startereinheit aus. Der Einbau von Pipecolinsäure ist aus dem Immunsuppressor Rapamycin bekannt. Die Biosynthese von Pipecolinsäure wird bei diesem durch die Umsetzung von L-Lysin mittels einer Cyclodeaminase bewerkstelligt (Molnar *et al.*, 1996). Daher sollten neben einem weiteren NRPS-Lademodul ein L-Lysin Cyclodeaminase kodierendes Gen innerhalb des Genclusters vorliegen. Die durchschnittliche Größe von NRPS-Extensionsmodulen ohne optionale Domänen beträgt ca. 4 kb. Ein PKS-Modul mit vollständiger reduktiver Schleife ist ca. 6 kb groß. Zusammen mit dem NRPS-Lademodul und dem die Cyclodeaminase kodierenden Gen sollte die Mindestgröße des Genclusters ca. 30-32 kb betragen. Dazu kommen noch modifizierende Gene. Dies sind drei Methyltransferasen (zwei N-Methyl- und eine C-Methyltransferase), eine Oxidationsdomäne, zwei Monooxygenasen sowie zwei Acyltransferasen. Dabei können die kodierenden Gene sowohl als Domänen innerhalb eines Moduls, als auch als distinkte Gene stromauf- bzw. stromabwärts des Tubulysin-

Biosynthesegenclustern kodiert liegen. Zuzüglich dieser Gene müsste das Gencluster eine Größe von ca. 40-42 kb haben.

1.7 Zielsetzung

Zu Beginn dieser Arbeit war für das Myxobakterium *A. disciformis* An d48 kein Mutageneseprotokoll bekannt. Das erste Ziel war daher die Etablierung eines Mutageneseverfahrens, sowie die Optimierung der Wachstumsbedingungen für diesen Bakterienstamm. Mittels des etablierten Mutageneseprotokolls sollte durch die Inaktivierung verschiedener Hybrid-Gencluster eine nicht produzierende Tubulysin-Mutante erzeugt werden und somit zur Auffindung des Biosynthesegenclusters führen. Als Inaktivierungskonstrukte sollten NRPS- bzw. PKS-Fragmente verwendet werden, die aus dem Bakterium amplifiziert und kloniert werden. Diese Fragmente sollten nach der Erstellung einer Cosmidbank von *A. disciformis* An d48 als homologe Sonden in verschiedenen Hybridisierungsversuchen eingesetzt werden und somit zur Entdeckung von Cosmiden führen, die Teile des Genclusters tragen.

Nach der Sequenzierung und Annotation des Tubulysin-Genclusters sollte die dazugehörige Biosynthese untersucht werden. Schließlich sollten durch das Erzeugen von Insertionsmutanten spezifische Gene des Clusters inaktiviert werden, um genauere Einsicht in die Biosynthese des Tubulysins zu erhalten. Diese Versuche sollten die Grundlage für folgende biokombinatorische Versuche darstellen, um unterschiedliche Tubulysin-Derivate erzeugen zu können.

Die Identifizierung einer Tubulysin negativen Mutante wird durch die geringe Produktion dieses Naturstoffes erschwert. Durch den niedrigen Extinktionskoeffizienten ist eine Detektion der Substanz mittels DAD-gekoppelter HPLC-Analyse im Hochdurchsatz nicht möglich. Die Auffindung einer solchen Mutante sollte in dieser Arbeit über einen Cytotoxizitätstest (Sasse *et al.*, 2000) erfolgen, welcher für diese Versuche optimiert werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien wurden von den in Tab. 2.1.1 folgenden Firmen in p. A. Qualität bezogen. Falls nicht explizit beschrieben, haben die Firmen ihren Sitz in Deutschland.

Tab. 2.1.1: Versuchsspezifische Chemikalien und ihre Bezugsquellen.

Chemikalie	Hersteller
Aceton Chloroform Ethanol Methanol 2-Propanol	J.T. Baker, Niederlande
Bacto-Agar Tryptone Peptone (Trypton) Hefeextrakt	Difco, Augsburg
Agarose ultra PURE® Trypsin	GIBCO/ BRL (Life Technologies), Eggenstein
Ammoniumacetat EDTA Kaliumhydroxid	Fulka, Neu-Ulm
Bromphenolblau Calciumchlorid Essigsäure D(+)-Glucose-Monohydrat Glycerin (87%) HCl Magnesiumsulfat Haptahydrat Natriumchlorid Natriumcitrat Natriumhydroxid Stärke, löslich	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Blockierungsreagenz CDP-Star Desoxynucleosid-Triphosphate N -lauroylsarcosine	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Amberlite® XAD 16	Rohm & Haas, Frankfurt
Ampicillin 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid (X-Gal) Ethidiumbromidlösung (1%) Formamid, deionisiert	ROTH, Karlsruhe

Chemikalie	Hersteller
Isopropyl-β-D-thiogalactosid (IPTG) HEPES Maleinsäure Natriumlaurylsulfat (SDS) Roti®Phenol-Chloroform Triton-X 100 Tween 20	ROTH, Karlsruhe
Kanamycin A (Monosulfat) Chloramphenicol Magnesiumsulfat Na ₂ -Succinat x 6 H ₂ O N-Lauroylsarcosin, Na-Salz Stärke löslich Tris[hydroxymethyl]aminomethan (Trizma® Base)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen / St. Lewis, USA

2.1.1 Enzyme und „Fertig-Gebrauchs-Kits“

Die verwendeten Enzyme und Kits der verschiedenen Firmen wurden von den verschiedenen Firmen benutzt, die in Tab. 2.1.2 angegeben sind.

Tab. 2.1.2: Verwendete Enzyme und Kits mit Angaben der jeweiligen Hersteller.

Produkt	Hersteller
EZ::TNTM KAN-2> Tnp Transposome™	Epicentre
Triple Master®PCR System	Eppendorf, Hamburg
1kb-DNA-Ladder Klenow Large Fragment of DNA Polymerase I Oligonukleotide Taq DNA-Polymerase	GIBCO/ BRL(Life Technologies), Eggenstein
Puregene™ - DNA Isolation Kit	Gentra Systems
TOPO TA Cloning® Kit (Version K) TOPO XL Cloning® Kit	Invitrogen, Californien, USA
Nucleospin® Extract Nucleospin® Plasmid	Macherey und Nagel
Proteinase K	Merck, Darmstadt
Alkalische Phosphatase, Calf intestinal (CIP) 100 bp-DNA-Ladder Restriktionsendonukleasen T4-DNA Ligase GPS-1 Genome Priming System	New England Biolabs (NEB), Schwalbach
Desoxyribonuclease A (Dnase) Ribonuclease A (RNase, DNase-frei)	ROTH, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraktion Kit	QIAGEN, Hilden
Desoxynucleoside Triphosphate Set, PCR Grade Expand High Fidelity PCR system DIG-Labeling and Detection Kit DNA Molecular Weight Marker III	Roche, Mannheim

Produkt	Hersteller
Lysozym	Serva, Heidelberg
Cloned Pfu DNA Polymerase Gigapack®II XL Packaging Extract	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.2 Lösungen, Puffer und Medien

Für die gesamte Arbeit wurde Wasser verwendet, das mit einer Milli-Q-Anlage der Fa. Millipore (Eschborn) deionisiert wurde. Zusätzlich wurde das Wasser bei Bedarf für 20 min bei 121°C autoklaviert.

Sämtliche Lösungen, Puffer bzw. Medien wurden mit einem pH-Meter - vom Typ Digital pH-Meter der Fa. Knick - auf den benötigten pH-Wert eingestellt. Durch Instabilität mancher Substanzen gegenüber erhöhter Temperaturen mussten diese sterilfiltriert werden. Dafür wurden Sterilfilter der Fa. Milipore verwendet. In der folgenden Tab. 2.1.3 werden die Bestandteile der verwendeten Lösungen sowie Sterilisationsverfahren und Lagerung angegeben.

2.1.2.1 Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

Tab. 2.1.3: Puffer und Lösungen für molekularbiologische Arbeiten.

Bezeichnung	Bestandteile	Sterilisationsverfahren und Lagerung
Denaturierungslösung 1	NaOH NaCl (5 M) H ₂ O	20 g 333 ml ad 1 l bei RT lagern
Denaturierungslösung 2 (Koloniehybridisierung)	NaOH NaCl SDS (10 %) H ₂ O	20 g 87,7 g 10 ml ad 1 l bei RT lagern
Depurinierungslösung	HCl (1 M) H ₂ O	250 ml ad 1 l bei RT lagern
DNA-Auftragspuffer (6fach)	Glycerin (87 %) Bromphenolblau Xylencyanol H ₂ O	3 ml 25 mg 25 mg ad 10 ml bei RT lagern
EDTA-Lösung (0,5 M; pH 8,0)	EDTA NaOH H ₂ O	186 g 20 g ad 1 l autoklavieren; bei RT lagern

Bezeichnung	Bestandteile		Sterilisationsverfahren und Lagerung
GYT-Lösung	Glycerin Hefeextrakt Trypton H ₂ O	20 ml 250 mg 500 mg ad 200 ml	autoklavieren; bei 4°C lagern
Glycerin 10%	Glycerin H ₂ O	115 ml ad 1 l	autoklavieren; bei RT lagern
Glycerin 50%	Glycerin (87%) H ₂ O	57,5 ml ad 100 ml	autoklavieren; bei RT lagern
Hybridisierungslösung	SSC (20x) Blockierungslösung (10 %) SDS (10 %) N-Lauroylsarcosin (5 %) Formamid (50 %) H ₂ O	25 ml 20 ml 0,2 ml 2 ml 50 ml ad 100 ml	autoklavieren; bei 4°C lagern
IPTG-Lösung (0,1 M)	IPTG H ₂ O	240 mg ad 10 ml	sterilfiltrieren, bei -20° C lagern
K ₂ HPO ₄ (1 M)	K ₂ HPO ₄ H ₂ O	174 g ad 100 ml	bei RT lagern
KH ₂ PO ₄ (1 M)	KH ₂ PO ₄ H ₂ O	136 g ad 100 ml	bei RT lagern
Lysispuffer	NaOH 10 % SDS H ₂ O	20 mM 10 ml ad 100 ml	bei RT lagern
Maleinsäurepuffer	Maleinsäure NaCl H ₂ O	11,61 g 8,8 g ad 1 l	pH 7,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
Maleinsäurepuffer + Tween®20	Tween®20 Maleinsäurepuffer 1	0,3 ml ad 100 ml	0,3 ml Tween®20 werden zu 100 ml Maleinsäurepuffer 1 gegeben, stets frisch herstellen
Natriumacetat (NaOAc) (1M, pH 5,2)	NaOAc x 3 H ₂ O H ₂ O	41 g ad 100 ml	pH-Wert mit Eisessig einstellen
Natriumchlorid (5 M)	NaCl H ₂ O	580 g ad 100 ml	autoklavieren; bei RT lagern
Neutralisierungslösung 1	Tris-HCl (1M, pH 7,4) NaCl H ₂ O	500 ml 175,4 g ad 1 l	autoklavieren, bei RT lagern
Neutralisierungslösung 2 (Koloniehybridisierung)	Trizma Base NaCl H ₂ O	121,1 g 87,7 g ad 1 l	pH mit HCl (10 M) auf 7,5 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
Neutralisierungspuffer	3M Kaliumacetat Eisessig H ₂ O	60 ml 11,5 ml ad 100 ml	autoklavieren; bei RT lagern
N-Lauroylsarcosin (5 %)	N-Lauroylsarcosin H ₂ O	5 g ad 100 ml	autoklavieren, bei 4°C lagern
RNase A-Lösung (1%)	RNase A (DNase-frei) Tris-Puffer (1 M; pH 7,4) NaCl (5 M) H ₂ O	10 mg 10 µl 3 µl ad 1 ml	sterilfiltrieren, bei 4° C lagern
SDS-Lösung (10 %)	SDS H ₂ O	10 g ad 100 ml	bei RT lagern
SET-Puffer	Tris-HCl (1 M, pH 7,4) NaCl (5 M) EDTA (0,5 M, pH 8,0) H ₂ O	5 ml 3,75 ml 12,5 ml ad 250 ml	autoklavieren, bei RT lagern

Bezeichnung	Bestandteile		Sterilisationsverfahren und Lagerung
SSC (20x)	NaCl Natriumcitrat x 2 H ₂ O H ₂ O	155,3 g 88,2 g ad 1 l	pH mit NaOH (10 M) auf 7,0 einstellen, autoklavieren
SM-Puffer	Tris-HCl (1 M, pH 7,4) NaCl MgSO ₄ x 7 H ₂ O Gelatine-Lösung (2 %) H ₂ O	50 ml 5,4 g 2 g 5 ml ad 1 l	autoklavieren, bei RT lagern
STET-Puffer	Saccharose Tris-HC (1 M, pH 7,4) EDTA (0,5 M, pH 8,0) Triton X-100 H ₂ O	8,55 g 5 ml 10 ml 5 ml ad 100 ml	autoklavieren, bei RT lagern
TAE-Puffer (50fach)	TRIZMA®Base Eisessig EDTA (0,5 M; pH 8,0) H ₂ O	242 g 57,1 ml 100 ml ad 1 l	bei RT lagern
TE-Puffer (pH 7,4)	Tris- HCl (1 M; pH 7,4) EDTA (0,5 M; pH 8,0) H ₂ O	5 ml 1 ml ad 500 ml	autoklavieren, bei RT lagern
Tris-HCl (1 M; pH 7,4)	TRIZMA®Base H ₂ O	60,5 g ad 500 ml	Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern
Tris-HCl (1 M; pH 8,0)	TRIZMA®Base H ₂ O	60,5 g ad 500 ml	Tris in 400ml Wasser lösen, pH-Wert mit konz. HCl einstellen, mit Wasser auf 500ml auffüllen und autoklavieren, bei RT lagern
X-Gal-Lösung	X-Gal Dimethylformamid	400 mg ad 10 ml	Bei -20 °C lagern
Zellsuspensionspuffer	Glucose Tris EDTA H ₂ O	5 mM 2,5 mM 1 mM ad 100 ml	Autoklavieren; bei RT lagern

2.1.2.2 Kulturmedien und Stocklösungen für die Anzucht von Bakterien

2.1.2.2.1 Kulturmedien für die Anzucht von *Escherichia coli* Stämmen

Sämtliche Flüssig- und Festmedien wurden durch 20 minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Zur Herstellung von Festmedien wurde den jeweiligen Medien 1,5% (w/v) Agar zugesetzt (s. Tab. 2.1.1).

Tab. 2.1.4: Medien für die Kultivierung von *E. coli* Stämmen.

Bezeichnung (Referenz)	Bestandteile	Herstellung / Lagerung
LB-Medium (Sambrook <i>et al.</i> , 1989)	Trypton Hefeextrakt NaCl H ₂ O	10 g 5 g 5 g ad 1 l mit 10 M NaOH auf pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern
2YT (Miller, 1972)	Tryptone Peptone Hefe-Extrakt NaCl H ₂ O	20 g 10 g 5 g ad 1 l mit 10 M NaOH pH 7,0 einstellen, autoklavieren, bei RT lagern

2.1.2.2.2 Kulturmedien für die Anzucht von Myxobakterien

Die Medien wurden durch 20 minütiges autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Für das Ausplattieren auf Festmedien wurde den jeweiligen Medien 1,5% (w/v) Agar zugesetzt. Im Gegensatz zum Ausplattieren von *E. coli* Zellen, wurden die verschiedenen Myxobakterien mit Softagar auf Festmedien vereinzelt (2.5.15.1). Für die Herstellung von Softagar wurden den Medien 0,75% (w/v) Agar zugesetzt.

Tab. 2.1.5: Kulturmedien und andere Substanzen zur Anzucht von Myxobakterien.

Bezeichnung [Referenz]	Bestandteile	Herstellung / Lagerung
Trypton-Medium (Silakowski <i>et al.</i> , 1998)	Trypton MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O	10 g 2 g ad 1 l pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen; autoklavieren und bei RT gelagert
M7-Medium (Sasse, 1995)	Probion CaCl ₂ x 2 H ₂ O MgSO ₄ x 7 H ₂ O Hefeextrakt HEPES Stärke löslich Glucose 20 % Vitamin B12 Stocklösung H ₂ O	5 g 1 g 1 g 1 g 10 g 5 g 10 ml 1 ml ad 1 l pH mit NaOH (5M) auf 7,2 einstellen; autoklavieren und bei RT lagern
Glucose (20%)	D(+)-Glucose-Monohydrat H ₂ O	20 g 100 ml Sterilfiltrieren; bei RT lagern (karamellisiert bei autoklavieren)
Vitamin B12 Stocklösung (1 mg/10 ml)	Vitamin B12 Wasser	100 mg ad 1 l sterilfiltrieren; bei 4°C lagern
VY/2-Medium [Sasse; pers. Mitteilung]	Bäckerhefe CaCl ₂ x 2 H ₂ O	5 g ad 1 l pH mit NaOH (5M) auf 7,2 einstellen; autoklavieren und bei RT gelagert
TS-Medium [Kunze; pers. Mitteilung]	Trypton Stärke HEPES MgSO ₄ x 7H ₂ O H ₂ O	10 g 4 g 11,9 g 2 g ad 1 l pH mit KOH (10 M) auf 7,2 einstellen; autoklavieren und bei RT gelagert

2.1.2.2.3 Antibiotikastocklösungen

Es wurden von den Substanzen Stocklösungen hergestellt, sterilfiltriert und bei -20°C in Aliquots aufbewahrt. Die in den Medien verwendeten Endkonzentrationen sind in der folgenden Tabelle angegeben. Der Zusatz der jeweiligen Antibiotika zu den Medien erfolgte nach Autoklavieren und einem Abkühlen auf ca. 60°C .

Tab. 2.1.6: Verwendete Antibiotika.

Anibiotika	Stocklösung	Endkonzentration im Medium
Ampicillin	100 mg/ml H ₂ O	100 µg/ml (high copy plasmid) 50 µg/ml (low copy plasmid)
Gentamycin	10 mg/ml H ₂ O	10 µg/ml
Kanamycin A	50 mg/ml H ₂ O	50 µg/ml
Tetracyclin	10 mg/ml MeOH	5 µg/ml

2.2 Mikroorganismen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in der folgenden Tabelle angegeben.

Tab. 2.2.1: Übersicht aller verwendeten Mikroorganismen.

Organismus	Genotyp bzw. Eigenschaft	Referenz
<i>E. coli</i> Sure®	e14 ⁻ (McrA ⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac rec B rec J sbcC umuC::Tn5(Kan ^r) uvrC [F'proAB laqIq Z Δ M15 Tn10 (Tet ^r)] ^c	Greener (1990), Stratagene
<i>E. coli</i> TOP10	F ⁻ mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 deoR araD139 Δ (araleu)7697 galU galK rpsL (Str ^r) endA1 nupG	Invitrogen (USA)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	F ⁻ ::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ (lacZ)M15/ recA1 endA1 gyrA96 (Tet ^r) thi hsdR17 (r _K -m _K ⁺) supE44 relA1 lac	Bullock <i>et al.</i> (1987)
<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ endA1 SupE44, Δ lacU169 (Φ 80 lacZ Φ M15) hsdR17, recA1, andA1, gyrA96, Fhi-1, relA1	(Hanahan, 1985)
<i>E. coli</i> DH5 α λ pir	λ pir Lysogen von DH5 α	
<i>E. coli</i> GM2163	F ⁻ ara-14 leuB6 fluA31 lacY1 tsx78 gluV44 galK2 galT22 mcr22 mcrA dcm-6 hisG4 rfbD1 rpsL136 (Str ^r) xylA5 dam13::Tn9(Cm ^r) mtl-1 thi-1 mcrB1 hsdR1	New England Biolabs (NEB), Schwalbach

Organismus	Genotyp bzw. Eigenschaft	Referenz
<i>Angiococcus disciformis</i> An d48	produziert Angiolam, Myxothiazol, Tubulysine, Myxochelin	Reichenbach <i>et al.</i> 1994 - Kreta, Griechenland
<i>Archangium gephyra</i> Ar 315	produziert Argyrine, Tubulysine	Reichenbach <i>et al.</i> 1973 - Freiburg
<i>Cystobacter ferrogeneus</i> Cb fe22	produziert Argyrine, Stigmatelline, Tubulysine	Reichenbach <i>et al.</i> 1987 - Agrigent, Sizilien
<i>Cystobacter minor</i> Cb m20	produziert Argyrine, Archazolide, Tubulysine	Reichenbach <i>et al.</i> 1998 - Bangalore, Indien
<i>Cystobacter violaceus</i> Cb vi63	produziert Tubulysine	Reichenbach <i>et al.</i> 1995 - Lucknow, Indien
<i>Myxococcus xanthus</i> DK1622	Produktionsspektrum nicht vollständig bekannt	Bretscher und Kaiser, 1978 DK101 nach UV-Behandlung
<i>Stigmatella erecta</i> Pd e68	produziert Myxalamide, Myxothiazol, Aurachine, Tubulysine	Reichenbach <i>et al.</i> 1998 - Bali, Indonesien
<i>Stigmatella aurantiaca</i> Sg a15	produziert Myxochelin, Myxothiazol, Stigmatellin	Reichenbach <i>et al.</i> 1968

2.3 Plasmide

2.3.1 Verwendete Plasmide

In dieser Arbeit wurden die in der folgende Tabelle aufgeführten Vektoren eingesetzt.

Tab. 2.3.1: Verwendete Ausgangs-Plasmide.

Plasmid	Eigenschaften	Referenz
pCR®2.1-TOPO pCR® blunt-TOPO	Amp ^r , Kan ^r , <i>lacZα</i> , <i>f1 ori</i> , ColE1 <i>ori</i>	Invitrogen (Carlsbad, USA)
pUC18	Amp ^r , <i>rep</i> pMB1, <i>rop</i> ⁺ , <i>bla</i> , <i>lacZ</i>	Vieira & Messing, 1982
SuperCos	Amp ^r , Neo ^r , ColE1 <i>ori</i> , SV40 <i>ori</i> , <i>cos</i>	Stratagene (LA Jolla, USA)
pMycoMar	Gen ^r , R6Kγ <i>ori</i> , Kan ^r , T6 / T _{pase} in pPR23	Rubin <i>et al.</i> (1999)
p15A-oriT-tet-trpE	Cm ^r , <i>trpE</i> , <i>tet</i> ^r (pRK2), p15A <i>ori</i>	Genebridges, Dresden

2.3.1.1 Das Plasmid pMycoMar

Das Plasmid pMycomar (s. Anhang, S 160) enthält ein *HimarI* abgeleitetes Mini-Transposon *magellan4*. Innerhalb der „inverted repeats“ dieses Transposons liegt das Tn5 Kanamycin-Resistenzgen und der oriR6K kodiert vor. Diese Gene werden als

Vektor-Komponenten bei der Methode des „Transposon-recovery“ benötigt (s. 2.5.17). Dadurch konnten Plasmide mit genetischer Information aus dem Myxobakterium *Angiococcus disciformis* generiert werden, die im folgenden Abschnitt 2.3.1.2 beschrieben werden.

Das Transposon stammt aus der Superfamilie der *mariner*/Tc1 Transposons und wurde zuerst aus der Hornfliege *Haematobia irritans* isoliert. Zusätzlich zu *magellan4* wurde die *HimarI*-Transposase unter der transkriptionalen Kontrolle des T6 Promotors in das mycobakterielle Temperatur-sensitive Replicon pR23 kloniert.

2.3.1.2 Konstruierte Plasmide

Die in dieser Arbeit abgeleiteten Vektoren sind aus den unterschiedlichen Plasmiden der Tab. 2.3.1 generiert worden. Aufgelistet sind alle Konstrukte, die für die Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus dem Myxobakterium *Angiococcus disciformis* An d48 wichtig waren (s. Tab. 2.3.2). In einer weiteren Tabelle sind Plasmide aufgeführt, die Sequenzinformationen des genetischen Ursprungs weiterer Sekundärmetabolite erbrachten. Unter anderem von Strukturgenen der jeweiligen Biosynthesegenclustern als auch Genen, die an deren Regulation beteiligt sind (s. Tab. 2.3.3).

Tab. 2.3.2: Plasmide, die im Zusammenhang mit der Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters generiert wurden.

Bezeichnung	Eigenschaften
pMutT176/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 176 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI. Tubulysin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
pMutT524/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 524 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI. Tubulysin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
pMutT781/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 781 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI. Tubulysin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)

Bezeichnung	Eigenschaften
pMutT794/NotI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 794 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>NotI</i> . Tubulysin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
pMutT929/BamHI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 929 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>BamHI</i> . Tubulysin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
pASTIs1	Produkt aus TA-Klonierung von einem 889 bp großen Fragment aus <i>tubD</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar ASTIs1A/B amplifiziert. (Knockout-Konstrukt des Tubulysin-Biosynthesegenclusters)
pASTIs2	Produkt aus TA-Klonierung von einem 700 bp großen Fragment aus <i>tubC</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar ASTIs2A/B amplifiziert. (Knockout-Konstrukt des Tubulysin-Biosynthesegenclusters)
pTubA	Produkt aus TA-Klonierung von einem 560 bp großen Fragment aus <i>tubA</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar TubA _{up/down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>tubA</i>)
pOrf2-A	Produkt aus TA-Klonierung von einem 554 bp großen Fragment aus <i>orf2</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar Orf2 _{up/down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>orf2</i>)
pOrf2-B	Produkt aus TA-Klonierung von einem 1.204 bp großen Fragment aus <i>tubA</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar Orf2 _{up} /TubZ _{down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>orf2</i>)
pTubZ-A	Produkt aus TA-Klonierung von einem 570 bp großen Fragment aus <i>tubZ</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar TubZ _{up} / down amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>tubZ</i>)
pTubZ-B	Produkt aus TA-Klonierung von einem 1.629 bp großen Fragment aus <i>tubZ</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar TubZ _{up} /Orf1 _{down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>tubZ</i>)
pOrf1	Produkt aus TA-Klonierung von einem 572 bp großen Fragment aus <i>orf1</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar Orf1 _{up/down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>orf1</i>)
F5	Aus der Cosmidbank von An d48. Ligation der partial <i>Sau3A</i> verdauten chromosomalen DNA in <i>BamHI</i> geschittenen Supercos-Vektor (Träger-Cosmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
F7	Aus der Cosmidbank von An d48. Ligation der partial <i>Sau3A</i> verdauten chromosomalen DNA in <i>BamHI</i> geschittenen Supercos-Vektor (Träger-Cosmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
F11	Aus der Cosmidbank von An d48. Ligation der partial <i>Sau3A</i> verdauten chromosomalen DNA in <i>BamHI</i> geschittenen Supercos-Vektor (Träger-Cosmid von Teilen der Tubulysin-Genclustersequenz)
pASM12	12 kb großes Anschluß-Fragment an das Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus dem Cosmid F7 in pUC18 nach <i>PstI</i> / <i>EcoRI</i> Restriktion ligiert (Trägerplasmid zur Vervollständigung der Tubulysin-Genclustersequenz)

Bezeichnung	Eigenschaften
pZeoR	Produkt aus TA-Klonierung vom Zeocin-Resistenzgen (604 bp) in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem ET-Primerpaar ASexp1/2 amplifiziert. (Konstrukt zur Rekombination des Resistenzgens in pASM12)
pASexp7	Produkt aus ET – Rekombination des Zeocin-Resistenzgens in pASM12 (Konstrukt zur Rekombination der Anschluss-Sequenz in F5)
pAT	Produkt aus TA-Klonierung von einem 567 bp großen Fragment aus <i>tubG</i> in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels dem PCR-Primerpaar AT _{up/down} amplifiziert. (Inaktivierungskonstrukt von <i>tubG</i>)
pKSGAS1.1	Produkt aus TA-Klonierung von einem KS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter KS-Primer EAKSC/LCK5NC amplifiziert.
pKSGAS1.2	Produkt aus TA-Klonierung von einem KS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter KS-Primer EAKSC/LCK5NC amplifiziert.
pKSGAS1.4	Produkt aus TA-Klonierung von einem KS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter KS-Primer EAKSC/LCK5NC amplifiziert.
pKSGAS2.1	Produkt aus TA-Klonierung von einem KS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter KS-Primer EAKSC/LCK5NC amplifiziert.
pKSGAS2.5	Produkt aus TA-Klonierung von einem KS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter KS-Primer EAKSC/LCK5NC amplifiziert.
pPSGAS4.1	Produkt aus TA-Klonierung von einem PS- Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter NRPS-Primer LGG ₂₀₀₀ /TGD ₂₀₀₀ amplifiziert
pPSGAS5.2	Produkt aus TA-Klonierung von einem PS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter NRPS-Primer LGG ₂₀₀₀ /TGD ₂₀₀₀ amplifiziert
pPSGAS5.4	Produkt aus TA-Klonierung von einem PS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter NRPS-Primer LGG ₂₀₀₀ /TGD ₂₀₀₀ amplifiziert
pPSGAS7.5	Produkt aus TA-Klonierung von einem PS-Fragment in pCR2.1TOPO. Das Fragment wurde mittels der degenerierter NRPS-Primer LGG ₂₀₀₀ /TGD ₂₀₀₀ amplifiziert

Tab. 2.3.3: Plasmide, die Strukturgene bzw. regulatorische Gene tragen.

Bezeichnung	Eigenschaften
pMut222/BamHI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 286 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxochelin-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Myxochelin-Gencluster-Sequenz)
pMut286/BamHI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 286 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Überproduzente (Träger-Plasmid für regulatorische Elemente des Myxothiazol)

Bezeichnung	Eigenschaften
pMut348/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 348 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Überproduzente (Träger-Plasmid für regulatorische Elemente des Myxothiazol)
pMut399/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 399 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Überproduzente (Träger-Plasmid für regulatorische Elemente des Myxothiazol)
pMut422/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 422 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Überproduzente (Träger-Plasmid für regulatorische Elemente des Myxothiazol)
pMut550/<i>Not</i>I	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 550 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Angiolam-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Angiolam-Gencluster-Sequenz)
pMut649/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 422 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Überproduzente (Träger-Plasmid für regulatorische Elemente des Myxothiazol)
pMut716/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 422 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Myxothiazol-Gencluster-Sequenz)
pMut800/<i>Bam</i>HI	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 422 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Myxothiazol-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Myxothiazol-Gencluster-Sequenz)
pMut813/<i>Not</i>I	Fragment aus chromosomaler DNA der Transposon-Mutante 422 mittels Plasmid recovery gewonnen. Religation des Plasmids nach durchgeführter Restriktion mit dem Enzym <i>Bam</i> HI Angiolam-Knockout-Mutante (Träger-Plasmid von Teilen der Angiolam-Gencluster-Sequenz)

2.3.2 Oligonucleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer sind in den folgenden Tab. 2.3.4 bzw. Tab. 2.3.5 aufgelistet und wurden von der Fa. Invitrogen generiert.

Tab. 2.3.4: Primer, die zu Aufklärung der Sequenz des Tubulysin-Biosynthesegenclusters abgeleitet wurden.

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
ASTIs 1A	CAC CCG GAC CTG CCT GGA TTC	889 bp großes PCR-Amplifikat aus <i>tubD</i> für Generierung einer Tubulysin-Knockout-Mutante mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
ASTIs 1B	TGC TCG GCT GGC GCT ACT CAC	
ASTIs 2A	GCT CCC GGG CCA CGT GGT TGA AGA	700 bp großes PCR-Amplifikat aus <i>tubC</i> für Generierung einer Tubulysin-Knockout-Mutante mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
ASTIs 2B	CCG CGG GCC GTG GCA GTG GTG TA	
TubZ _{up}	GGA GGT GGC CGT GCA GAG GAT GTC	570 bp großes DNA-Fragment aus <i>tubZ</i> zur Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination
TubZ _{down}	CTG CAC GCG CTG ATG GAT GAG GTC	
Orf1 _{up}	TCC AGG TAG GCA GAT TGA GAC	554 bp großes DNA-Fragment aus <i>orf1</i> zur Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
Orf1 _{down}	CAG CGG CAG TGG AGT GAA G	
Orf2 _{up}	CCC TTC GGC AGC CCC AAC AT	572 bp großes DNA-Fragment aus <i>orf2</i> zur Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
Orf2 _{down}	GCC CGG CAA GAC AGA GC	
TubA _{up}	CAG CAT GTC GAG GCA GAG C	560 bp großes DNA-Fragment aus <i>tubA</i> zur Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
TubA _{down}	TCC CGA GCA TCC AAC GCA GAG	
Tls _{up}	TGG CAG CCA GCC CGA GC	123 bp großes DNA-Fragment das hinter <i>tubF</i> codiert liegt. Amplifikat wurde als makierte Sonde eingesetzt, um Anschluss-Sequenz zum Gencluster zu identifizieren.
Tls _{down}	CCG CGG GTG CCC TCT CAT C	

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq _{TE}	GAC GCT GCT GCG GCC ACC TCA CG	Sequenzierprimer aus der TE aus <i>tubF</i> . Ebenfalls PCR Primer, der mit Tls _{down} zusammen ein 251 bp großes DNA-Fragment ergibt und als markierte Sonde eingesetzt wurde.
AT _{up} AT _{down}	GAC GCC ACC TCG CTA CCT GGA GCG ¹⁾ CGG CGA GGT CTG CTG GTG GTG	560bp großes DNA-Fragment aus <i>tubA</i> zur Geninaktivierung mittels gerichteter Insertion durch homologe Rekombination.
PSLGG ₂₀₀₀ PSTGD ₂₀₀₀	GCC GCC SAG SNY GAA GAA TCS TCG TG GGC ACS SGS ATG TAC CGC ACS GGC GAC C	Degenerierte NRPS-Primer zur Identifizierung und Amplifikation unbekannter Peptidsynthetase-Sequenzen.
EAKSC LCK5NC	MGI GAR GCI YTI GCI ATG GAY CCI CAR CAR MG GGR TCN CCI ARY TGI GTI CCI GTI CCR TGI GC	Degenerierte KS-Primer zur Identifizierung und Amplifikation unbekannter Polyketidsynthase-Sequenzen.
PS4.1 _{up} PS4.1 _{down}	GGG CCG CCT GGT CTC CTA CG ACG CCC GCC AGT TGT GCT	323 bp großes DNA-Amplifikat, dass aus pPSGAS4.1 generiert wurde
PS5.2 _{up} PS5.2 _{down}	GCC GCC CAG CAT GAA GAA GT CCC CGA AGC GCA AGA GGT G	367 bp großes DNA-Amplifikat, dass aus pPSGAS5.2 generiert wurde
PS5.4 _{up} PS5.4 _{down}	GTC GAT GCC CAC CGT CTC CA CCG CGC CGA TAG CCA GGT GA	415 bp großes DNA-Amplifikat, dass aus pPSGAS5.4 generiert wurde
PS7.5 _{up} PS7.5 _{down}	GGA GCT GGG CGA GGT GGA G GGG GTG GCC GTG ACT TC	285 bp großes DNA-Amplifikat, dass aus pPSGAS7.5 generiert wurde
pTOPOFor2.1 pTOPORev1	GGG AAC CGG AGC TGA ATG AAG CCG CGC CAC ATA GCA GAA CT	Sequenzierprimer aus dem TOPO-Vektor in 5'→3' Richtung Sequenzierprimer aus dem TOPO-Vektor in 5'→3' Richtung
Kana _{up} Kana _{down}	GGG CGC CCG GTT CTT TTT G ACA CCC AGC CGG CCA CAG TCG	PCR-Primer zur Amplifikation des Kan ^r (Tn5). PCR-Nachweis zur Generierung einer Kanamycin-resistenten Mutante
SB35Scre SB36Scre	TGG GTA TAA ATG GGC TCG CGA TA TCA CCG AGG CAG TTC CAT AGG A	PCR-Primer zur Amplifikation von 642 bp großem Fragment der <KAN-2> (Tn903). PCR-Nachweis des EZ::TN-Transposons.

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
1A 1Brev	TCT GGT CCT GAG CGA TGA GTG CTG GGG CTG GAG AAA GTG G	715 bp großes DNA-Fragment aus 12 kb Anschußsequenz zum Tubulysin-Gencluster. PCR-Amplifikat zur Kontrolle der Colinearität der Deuqenz innerhalb des Chromosoms.
2A 2Brev	GGT TGC CAG CCC GAG TTC T TCG GGC ACT CGG AAA ACA G	977 bp großes DNA-Fragment aus 12 kb Anschußsequenz zum Tubulysin-Gencluster. PCR-Amplifikat zur Kontrolle der Colinearität der Deuqenz innerhalb des Chromosoms.
3A 3Brev	TTG GGC TCC GTG CGT AGA AGG GAA TCC ACC TCG AAC AAC CAC	1.160 bp großes DNA-Fragment aus 12 kb Anschußsequenz zum Tubulysin-Gencluster. PCR-Amplifikat zur Kontrolle der Colinearität der Deuqenz innerhalb des Chromosoms.
4A 4Brev	CAC TTT CGG ACG AGC GCA TCA GGT AGC ACC CGC AAT GTC ACC GTC AGT	1.088 bp großes DNA-Fragment aus 12 kb Anschußsequenz zum Tubulysin-Gencluster. PCR-Amplifikat zur Kontrolle der Colinearität der Deuqenz innerhalb des Chromosoms.
5A 5Brev	GCG CGA GCT CGG GGA CTT CCG GCG CGA GGA TGT TGC	1.149 bp großes DNA-Fragment aus 12 kb Anschußsequenz zum Tubulysin-Gencluster. PCR-Amplifikat zur Kontrolle der Colinearität der Deuqenz innerhalb des Chromosoms.

¹⁾ farbig und unterstrichen sind die Nucleotide dargestellt, die mit der Ausgangssequenz nicht übereinstimmen.

Tab. 2.3.5: Oligonucleotide für die Charakterisierung verschiedener Transposon-Mutanten von *A. disciformis* An d48.

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
K-388	TGG GAA TCA TTT GAA GGT TGG	Sequenzierprimer aus dem <i>HimarI</i> Mini-Transposon <i>magellan4</i> 5'→3'
K-389	TGT GTT TTT CTT TGT TAG ACC G	Sequenzierprimer aus dem <i>HimarI</i> Mini-Transposon <i>magellan4</i> 3'→5'
K-390	GGG TAT CGC TCT TGA AGG GAA C	Sequenzierprimer aus dem <i>HimarI</i> Mini-Transposon <i>magellan4</i> 3'→5'

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq286/8	GCT GGC GTC ACG GGC TAT G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq286/81	CGG CCG TCA AGC CCC CAG ATG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/8
Seq286/82	GCG GGC GCG GAC TTC GGA G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/81
Seq286/83	TTG CCG GCC CAG AAG TCC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/82
Seq286/84	GAC GAC CAC CTG CTC GG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/83
Seq286-8rev	ATG GCG GGA AGA CCT GGG AGA CGA	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq286-8rev1	GCT CGT CAC CTT GCT GAT G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq286-8rev2	GGG CGG CTT CCA TCA CCT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq286/9	AGC TCC AGC GTC ACT CCA C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq286/91	GGG TCA TGC CAA GCG TTC TAA AT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/9
Seq286/92	CTG TCC GTC TAC TTC TCG C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/91
Seq286/93	CGG AAG GGT GAT GCG GTG TG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq286/92
Seq286-9rev	TCG CTT CGC CCC TGG ATG GAC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq286-9rev1	GGA GTT CGG CGG CAC CTT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut286/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348/8	GAC GGC GCA TCC TCC TG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von Sequenz mit K-388

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq348/81	GGT ACC GGG TGG CCG AGG AG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/8
Seq348/82	GCC ACA TCG ATG CGC TCG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/81
Seq348/83	CCT CGA CGG AAT CCC CCT CTG G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/82
Seq348-8rev1	GAT GCG CCG TCC GCG CC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-8rev2	CGT CCG GCT TCA CCG GC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-8rev3	GGC GTC TGG AGC GCG GCG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-8rev4	CGG AGA CCT TGG AGC GC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348/9	CGC GCC ACC TGG AGC ACC TG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq348/91	GTC CTT GCG GCG GTC CAT CTC C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/9
Seq348/92	GAG AAC GGT GGC CAG CTT GG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/91
Seq348/93	CAG CAG CAC GTA GGG CAG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/92
Seq348/94	CAG GCC CAG GCC GGT GCC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq348/93
Seq348-9rev	TGG ACG TCA GCC GCA TTA C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-9rev1	CGA GGA GCT GGC GGA GAT GGA	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq348-9rev2	CGT CAA CCG CAT CCT GG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-9rev3	GGC CCC GCA CCT CAT CTT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq348-9rev4	GAG CGC GCT CGG CCA GG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut348/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq399/8	CCT TGC TGT GCG AAA CCA G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq399/81	CCA TCA TCG GTC CAC TCG TAG A	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/8
Seq399/82	GGT GTT GCC ACT CCC GAG C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/81
Seq399/83	GCA TTG CCC GTG TAG CGC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/82
Seq399-8rev0	CCG TGT ACC TCA GGT TCT C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq399-8rev	ACC GCG CAC TGC CCG ACA TC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq399/9	AGG TCC TCG CCG CTG CTC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq399/91	GGG TCA TGC CAA GCG TTC TAA AT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/9
Seq399/92	GCA CAA GGT CTG GTC GTG AC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/91
Seq399/93	CCC TGC TCG AGT CAA AGC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq399/92
Seq399-9rev	ACC GCG CTC TCG ACA ATC TCT TC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq399-9rev1	GCT GGG TGT GTC CAC AGT	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut399/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq422/8	CCA GGT GCG CCG ATG CG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut422/ <i>NotI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq422/81	CCA TCC TTC GAC GCA CTC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut422/ <i>NotI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq422/8
Seq422/9	GCC GGA CCT CCG CCG CG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut422/ <i>NotI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq550/8	GGG AGT CGC ATC GAC CG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut550/ <i>NotI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq550/9	GAG GAA GGA GCC ATC GGG C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut550/ <i>NotI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq649/8	CGT GCC CGT GCT CTA CTT CG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq649/81	CGC GCA CAA GAT GAG CAC CAG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq649/8
Seq649/82	CAT GTA CCA GGT GGT CTC G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq649/81
Seq649/83	CTG TTG GCC GGT TGC AAC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq649/82
Seq649-8rev	GCA GGG CGC GCT CCA CG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq649-8rev1	CGC GGA ACC ACA GGG GGA	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 5'→3' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq649/9	TCC GGG GGC GAG GTG GTG TC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390
Seq649/91	CCG TGA GGA TGG CCG TCT GGT TGG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq649/9
Seq649/92	GGC CGG CGA GCG GAA GCT C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>BamHI</i> in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq649/91

Bezeichnung	Sequenzabfolge (5'→3')	Verwendung
Seq649-9rev	CAG TCC GCG TCC AAC CCA G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq649-9rev1	CAC TCG ACG ACG CGC GCG	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut649/ <i>Bam</i> HI in 3'→5' Richtung; Doppelstrang-Sequenzierung
Seq813/8	AGA GAC GAA CCG GCG GGA TTT G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut813/ <i>Not</i> I in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-388
Seq813/81	CTC CCG CCC TGA AGA ACT G	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut813/ <i>Not</i> I in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq813/8
Seq813/82	CTC CCG TCC GGC GCT TCC	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut813/ <i>Not</i> I in 5'→3' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit Seq813/81
Seq813/9	CCG TCC AAG CTG CAT CGT GTT C	Sequenzierprimer für das Plasmid pMut813/ <i>Not</i> I in 3'→5' Richtung; abgeleitet von der Sequenzierung mit K-389 und K-390

2.3.3 Geräte

- **Agarosegelelektrophorese**

Spannungsquelle Standard Power Pack 25 (Fa. Biometra, Göttingen)

- **Bilddokumentation**

UV-system version 1.73a digit store duo (Fa. Intas)

- **HPLC**

DAD-gekoppelte HPLC Series 1100 (Fa. Hewlett und Packard)

- **Inkubator**

Kühlinkubator MIR-1 (Fa. Sanyo)

- **PCR**

Mastercycler Gradienten (Fa. Eppendorf)

- **pH-Messungen**
pH-meter 766 Calimetic (Fa. Knick)
- **Photometer**
Ultrospec 2100 pro UV/Visble Spectrophotometer (Fa. Pharmacia)
- **Sterilisation**
Autoclav SPA (Fa. Fedigari)
- **Vakuumblotter**
Modell 785 (Fa. BioRad)
- **Wasseraufbereitung**
Milli-Q water purification system (Fa. Milipore)
- **Werkbank**
HeraeusLaminAir[®] (Fa. Kendro Laboratory Products GmbH, Hanau)
- **Zellzüchtung**
Multitron-Schüttler (Fa. Infors; Bottmingen, Schweiz)
- **Zentrifugen**
Zentrifuge 5804R (Fa. Eppendorf)
Tischzetrifuge 5415D (Fa. Eppendorf)
RC-5B Kühlzentrifuge (Fa. Sorvall)

2.4 Kultivierung und Stammhaltung von Mikroorganismen

2.4.1 Kultivierung und Konservierung von *Escherichia coli* Stämmen

Die Anzucht der *E. coli* Stämme (s. Tab. 2.2.1) erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie. Die Vereinzelung der Zellen wurde durch das 13-Strichverfahren (Schlegel, 1992) erhalten. Eine Einzelkolonie wurde in 3-5 ml LB-Flüssigmedium transferiert und für 12-16 h bei 30 bzw. 37°C und 170 rpm kultiviert. Bei Anzucht auf Festmedien wurden die jeweiligen Petrischalen ebenfalls bei 30 bzw. 37°C, kultiviert. Plasmidhaltige Stämme wurden unter Selektionsbedingungen mit den jeweiligen Antibiotika in den Medien angezogen.

Für eine Langzeit-Konservierung (Stammhaltung) wurden 2 ml Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden 1,0 ml einer ÜN-Kultur in ein 2 ml Kryoröhrchen der Fa. NalGene (USA) überführt und mit 1 ml einer sterilen 50% Glycerin-Stocklösung vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C. Cosmidbänke wurden in sterilen Mikrotiterplatten mit 50% Glycerin-Stocklösung konserviert. Die Klone wurden zunächst mit einem sterilen Metallstempel in die Vertiefungen mit je 150 µl LB-Medium transferiert und ÜN kultiviert. Nach Zugabe von je 100 µl Glycerin-Stocklösung wurden die Platten für 2 h bei 37°C inkubiert und danach bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein Tropfen der Glycerinkultur auf LB-Festmedium aufgebracht und vereinzelt. Die nach einer ÜN-Inkubation bei 37°C resultierten Einzelkolonien konnten für weitere Analysen herangezogen werden.

2.4.2 Kultivierung und Konservierung von Myxobakterien

Die verwendeten Myxobakterien Stämme wurden alle bei 30°C kultiviert und falls nicht anders beschrieben in Trypton-Medium (s. Tab. 2.1.5) angezogen. Für Flüssigkulturen wurde zunächst eine Einzelkolonie in 10 ml Medium angezogen, bis eine Zelldichte von

$1\text{-}2\cdot 10^8$ Zellen pro ml erreicht wurde. Die Bestimmung der Zelldichte erfolgte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Brand) mit einer Kammertiefe von 0,01 mm. Von diesen Kulturen ausgehend wurden dann 50 ml Medium in einer Verdünnung 1:10 bzw. 1:20 angeimpft und in 250 ml Erlenmeyerkolben auf einem Schüttelinkubator bei 170 rpm kultiviert. Die Zeitspanne der Kultivierung konnte von 2-12 Tagen dauern, was auf die jeweiligen Versuchsbedingungen abgestimmt wurde. Je nach Resistenzeigenschaften des Stammes bzw. der Mutante, wurde dem Medium das entsprechendem Antibiotika zugesetzt.

Für eine Langzeit-Konservierung wurden 15 ml der jeweiligen Kultur mit der Zelldichte von $1\text{-}2\cdot 10^8$ /ml abzentrifugiert (15 min; 5.000 g) und in 1 ml Medium resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde dann in ein 2 ml Kryoröhrchen überführt und mit 1 ml einer 50% Glycerin-Stocklösung vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubation bei 30°C wurden diese Röhrchen bei -80°C gelagert.

Zur Reaktivierung eines Stammes aus der Dauerkultur wurde ein Tropfen der Glycerinkultur auf Festmedium gebracht und für mindestens 48 h bei 30°C inkubiert. Die aus der Inkubation resultierenden Zellen wurden mit Hilfe einer Impföse abgekratzt und damit eine 10 ml Ausgangskultur inokuliert.

2.4.2.1 Kultivierung von *Stigmatella erecta* Pd e68

Die Anzucht von *S. erecta* Pd e68 Kulturen erfolgte ausgehend von Festmedium in 10 ml Trypton-Medium. Für die weitere Kultivierung größerer Volumina wurde eine 50 ml Kultur in 250 ml Erlenmeyerkolben angezogen. Da dieser Stamm zum größten Teil in festen, rundförmigen Aggregaten wächst, ließ sich für die Inokulation größerer Kulturen keine Zelldichte bestimmen. Nach einem Wachstum von 2-3 Tagen ergibt sich für diesen Stamm ein kleines Zeitfenster indem die Zellen in Suspension vorliegen. Nach kurzer Zeit können dann keine vereinzelter Zellen mehr mikroskopisch nachgewiesen werden.

Die Kultivierung dieses Stamm in M7 Medium (s. Tab. 2.1.5) erfolgte zur Anreicherung von Tubulysinen bzw. anderer Sekundärmetabolite. In diesem Medium konnte mikroskopisch kein Zeitfenster festgestellt werden, in dem die Zellen in Suspension vorliegen.

2.4.2.2 Kultivierung von *Angiococcus disciformis* An d48

Die Kultivierung dieses Stamms erfolgte wie unter 2.4.2 beschrieben wurde in Trypton-Medium (+ 0,2% Glucose und 10 ng/ml Vitamin B₁₂). Nach Erreichen einer Zelldichte von $1-2 \cdot 10^8$ Zellen / ml Kultur wurden 50 ml Medium 1:10 bzw. 1:20 angeimpft und für weitere 2-12 Tage. Nach 2-3 Tagen befindet sich die Kultur in der stationären Wachstumsphase und weist eine tief orange Färbung auf. Die Kultivierung dieses Stamms in M7 Medium (s. Tab. 2.1.5) erfolgte zur Anreicherung von Tubulysinen bzw. anderer Sekundärmetabolite. In diesem Medium wächst der *A. disciformis* An d48 inhomogen. Nach wenigen Tagen der Kultivierung kommt es durch die Lyse der Nährstoffpartikel zu einer „Aufhellung“ des Mediums, bis dieses transparent erscheint. Für die Erstellung einer Expressionskinetik wurden für jeden Zeitpunkt (Tag) parallel drei Erlenmeyerkolben mit einer Zelldichte von $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml angeimpft und nach bestimmten Inkubationszeiten die Kulturen extrahiert (s. 2.4.3.1).

2.4.2.2.1 Kultivierung von *Angiococcus disciformis* An d48 in Mikrotiterplatten

Nach der Generierung einer *magellan4* Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 (s. 2.5.16) wurden die einzelnen Klone mit einer Impföse von den Petrischalen in eine Vertiefungen der jeweiligen Mikrotiterplatte überführt. Die Mikrotiterplatten enthielten pro Vertiefung 200 µl M7 Medium (50 µg/ml Kanamycin). Die Platten wurden dann in einem mit Wasserdampf gesättigten, luftdicht verschlossenen Behälter für 7-10 Tage bei 32°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden insgesamt drei Kopien der gesamten Bank erstellt. Dafür wurden 50 µl jeder Kultur in drei neue Mikrotiterplatten mit 100 µl M7 Medium transferiert. Nach weiteren 7-8 Tagen Inkubation wurden zwei Kopien bei -80°C als Dauerkulturen weggefroren. Eine dieser Kopien wurde als 25% Glycerinkultur dauerkonserviert. Die beiden verbleibenden Kopien der Bank wurden für weitere Untersuchungen extrahiert (s. 2.4.3.2).

2.4.3 Kulturextrakte

2.4.3.1 Extraktion aus 50 ml Kulturen

Für die Untersuchungen der Bakterien-Kulturen auf die Bildung von Sekundärmetabolite wurden diese nach einer Methode von Dr. Florenz Sasse (persönliche Mitteilung) extrahiert.

Dafür wurden 50 ml Produktions-Medium M7 vor der Inokulation - mit einer bestimmten Zelldichte von Bakterien - mit 1 ml des Adsorberharzes XAD-16 (s. Tab. 2.1.1) versetzt. Durch die kontinuierliche Adsorption lipophiler Substanzen an das Harz wird die Produktion an Sekundärmetaboliten in diesen Kulturen zusätzlich erhöht. Sowohl zur Elution der Metabolite vom Harz als auch der Extraktion aus den Zellen wurden die Kulturen über ein feinmaschiges Sieb (250 µm Maschenweite) filtriert. Der Filtrerrückstand wurde dann in eine selbstgefertigte Säule überführt. Die Elution erfolgte durch die aufeinanderfolgende Zugabe von 20 ml Methanol und 30 ml Aceton. Bei dieser Methode ist darauf zu achten, dass die Tropfgeschwindigkeit der Säulen nicht zu hoch ist (ca. 1 Tropfen/sec), da die Elution der Metabolite dadurch stark beeinträchtigt wird.

Die Eluate wurden danach in einem Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt und die Rückstände in 500 µl Methanol (100x Konzentrat) resuspendiert. Die so erhaltenen Extrakte wurden dann für einen biologischen Assay (s. 2.5.22.2) bzw. nach erfolgter Filtration des Rohextraktes für eine HPLC-Analytik (s. 2.5.22.1) eingesetzt.

2.4.3.2 Extraktion aus Mikrotiterplatten

Für die Extraktion von Zellkulturen aus Mikrotiterplatten wurden dem Medium pro Vertiefung (s. 2.4.2.2.1) 10-20 Kugeln des Adsorberharzes XAD-16 zugegeben. Nach der Inokulation mit 50 µl Zellkultur wurden die Platten für 7-8 Tage bei 32°C inkubiert. Danach wurden die Kulturen in den einzelnen Vertiefungen der Mikrotiterplatten mittels N₂-Begasung und Erhitzen bei 37°C zur Trockne gebracht. Eine Elution erfolgt durch die Zugabe von je 100 µl Methanol, wobei die Platten nach kurzem Aufschütteln der Rückstände für 4 h bei RT mit dem Alkohol inkubiert wurden. Nach einer kurzen

Zentrifugation (2 min; 5.000 g) wurden die Überstände mit einer Mehrkanal-Pipette abgezogen und für einen biologischen Assay (s. 2.5.22.2) bzw. nach erfolgter Filtration für eine HPLC-Analytik (s. 2.5.22.1) eingesetzt.

2.4.4 Kultivierung von Zelllinien

In dieser Arbeit wurden für die biologischen Assays (s. 2.5.22.2) zum Nachweis von Tubulysinen eukaryontische Zellen der Krebszelllinie L 929 (NCTC Klon 929, ATCC CCL1) verwendet. Die Bezeichnung L929 leitet sich vom Klon 929 eines Stammes L, der von Bindegewebszellen einer männlichen C3H/An-Maus angelegt wurde, ab. Der Stamm L ist einer der ersten, der in kontinuierlicher Kultur gehalten werden konnte und ist eine sehr häufig verwendete Zellkultur für die Untersuchung der Karzinogenese *in vitro*. Die Zellen wachsen adhärent und haben das Aussehen von Fibroblasten.

Die Zelllinie wurde in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, einem CO₂-Gehalt von 10% und einer Luftfeuchtigkeit von über 95% angezogen. Die Kulturen wurden wöchentlich subkultiviert. Adhärent wachsende Zellen wurden dazu mit einem Zellschaber (Fa. Nunc) abgeschabt oder durch Behandlung mit 0,25% Trypsin (GibcoBRL) abgelöst. Die Vitalität der Zellkulturen wurde mit einem Invers-Mikroskop (Axiovert 35 der Fa. Zeiss) kontrolliert. Über eine Videokamera (AVT-BC1 der Fa. Horn, Aalen) konnte das kontrastverstärkte mikroskopische Bild auch über einen Monitor (Panasonic WV-5470) betrachtet werden.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Isolierung chromosomaler DNA aus Myxobakterien

Die Isolierung chromosomaler DNA aus Myxobakterien wurde in dieser Arbeit auf zwei verschiedene Arten durchgeführt. Zum einen nach der Methode von Neumann *et al.* (1992) und zum anderen mit dem Fertig-Gebrauchs-Kit Puregene (Gentra

systems). Beide Methoden eignen sich für die Aufreinigung hochmolekularer und qualitativ guter DNA mit hohem Reinheitsgrad.

2.5.1.1 Isolierung chromosomaler DNA nach Neumann *et al.* (1992)

Bei dieser Methode wurden 50 ml Bakterienkulturen verwendet, die sich in der stationären Wachstumsphase befanden. Diese Kulturen wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen passagiert und die Zellen bei 5.000 g für 20 min (5804R Fa. Eppendorf) sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml SET-Puffer resuspendiert und anschließend in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 µl 10% SDS-Stocklösung und 1 mg/ml Proteinase K wurden die Zellsuspensionen für zwei Stunden bei 56 °C unter vertikalem Schütteln inkubiert.

Nach dieser Inkubation wurde den lysierten Zellen 2 ml einer 5 M NaCl-Lösung zugegeben und nach vorsichtigem Schwenken mit 1 Vol Chloroform versetzt. Durch eine weitere Inkubation für 0,5-1 Stunde auf einem Überkopfschüttler mit 14 rpm (Typ L009 Rotator; Fa. Kisker, Mühlhausen) kam es zu einer guten Durchmischung der Lösung. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 4.000 g kommt es zu einer Trennung der wässrigen (DNA-haltigen) und apolaren Phase. Die wässrige Phase wurde mittels einer Pasteurpipette in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Aufreinigung mit 1 Vol Chloroform sooft wiederholt, bis die wässrige Phase vollständig transparent erschien.

Durch die Zugabe von 1 Vol Isopropanol zu der wässrigen Phase wurde die DNA durch vorsichtiges überkopfschütteln ausgefällt und in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Waschen des DNA-Pellets mit 70% Ethanol (5min bei 11.000 g) wurde dieses bei 55°C getrocknet und ÜN in einem angemessenen Volumen TE-Puffer (0,5-1,0 ml) resuspendiert.

2.5.1.2 Isolierung chromosomaler DNA mit Puregene (Gentra Systems)

Bei dieser Methode wurden 4 ml einer gut durchwachsenen ÜN-Kultur ($1,5 \cdot 10^9$ Zellen/ml) für 2 min bei 16.000 g (5415D; Eppendorf) sedimentiert. Das

Zellpellet wurde daraufhin in 300 µl Cell Lysis Solution (Lösung A) resuspendiert und für 5 min bei 80°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der lysierten Zellsuspension 1,5 µl RNase A Solution zugegeben und nach Durchmischen des Reaktionsgefäßes wiederum für 15-60 min bei 37°C inkubiert.

Die Proben wurden nach dieser RNase-Behandlung auf RT abgekühlt und mit 100 µl Protein Precipitation Solution (Lösung B) versetzt. Nach kräftigem Mischen (Vortexen) der Proben wurden diese für 3 min bei 16.000 g zentrifugiert, um eine Abtrennung der wässrigen DNA-Phase von den Zelltrümmern zu erreichen. Falls das Zellpellet zu diffus erschien, wurde die Probe nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis erneut gevortext und wiederum abzentrifugiert, bis ein festes Pellet erhalten wurde.

Durch die Zugabe von 300 µl Isopropanol zur wässrigen Phase wurde die DNA ausgefällt. Nach einer 1 minütigen Zentrifugation (11.000 g) zum Sedimentieren des DNA-Pellets, wurde dieses mit 70% Ethanol gewaschen (1 min; 11.000 g). Das Pellet wurde für 15 min bei RT getrocknet und in 50 µl DNA Hydration Solution (Lösung C) für 1 h bei 65°C gelöst.

2.5.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Bei diesen folgenden Methoden wurde die Plasmid-DNA jeweils aus einer 5 ml ÜN-Kultur der jeweiligen *E.coli* Zellen isoliert, die in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotika angezogen wurde. Bei der Isolierung von plasmidärer DNA macht man sich zu nutze, dass diese im Gegensatz zu linearer DNA unter alkalischen Bedingungen (pH > 11) nicht denaturiert. Durch eine nachfolgende Neutralisierung des Zellextraktes in hohen Salzkonzentrationen wird die chromosomale DNA wie auch Proteine als Dodecylsulfatkomplex ausgefällt.

2.5.2.1 Alkalische Lyse nach Sambrook *et al.* (1989)

Die Zellen aus einer 3 ml ÜN-Kultur wurden durch 1 minütiges Zentrifugieren bei 11.000 g sedimentiert. Nach Zugabe von 250 µl Zellsuspensionspuffer (s. Tab. 2.1.3) wurde das Zellpellet resuspendiert und mit 300 µl Lysispuffer vermischt. Nach einer

5 minütigen Inkubation bei RT wurde der Zellsuspension 300 µl Neutralisationspuffer zugesetzt, der gesamte Reaktionsansatz vorsichtig durchmischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach 10 minütiger Zentrifugation bei 16.000 g wurde der wässrige Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 700 µl Isopropanol die Plasmid-DNA gefällt. Optional kann vor der Fällung noch eine zusätzliche Erhöhung des Reinheitsgrades der DNA durch die Zugabe von 1 Vol. Phenol/Chloroform erreicht werden (vermischen und 10 min bei 16.000 g zentrifugieren).

Nach einer 30 minütigen Zentrifugation der Reaktionsansätze bei 4°C (13.000 rpm) wurde das DNA-Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 50 µl TE-Puffer oder H₂O_{dest.} resuspendiert.

2.5.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA mit „Boiling“-Präparation

Bei dieser Methode wurden die Zellen neben der Zugabe von Detergenzien zusätzlich durch kurzes Erhitzen auf 95°C aufgeschlossen. Die Zellen aus 1,5 ml einer ÜN-Kultur wurden zunächst abzentrifugiert (1min; 11.000 g) und in 500 µl STET-Puffer (s.Tab. 2.1.3) resuspendiert. Nach der Zugabe von 50 µl Lysozym-Lösung (10mg /ml) wurden die Reaktionsansätze für 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend für 30 sec bei 95°C gekocht. Die Proben wurden dann für 5 min zentrifugiert (16.000 g) und der Überstand mit 500 µl 75% Isopropanol/2,5 M Ammoniumacetat zum Fällern der DNA versetzt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die ausgefällte DNA abzentrifugiert (10 min; 16.000 g) und das Pellet mit 70% Ethanol (5 min; 16.000 g) gewaschen. Nach dem Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in 50 µl TE-Puffer oder H₂O_{dest.} resuspendiert.

2.5.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleospin® Plasmid-Kit

Die Präparation von hochreiner DNA, die für empfindliche enzymatische Reaktionen (wie z.B. DNA-Sequenzierung) eingesetzt werden sollte, erfolgte mit dem Nucleospin® Plasmid-Kit der Fa. Macherey und Nagel gemäß dem Hersteller-Protokoll. Das Prinzip dieser DNA-Aufreinigung liegt der alkalischen Lyse (s.2.5.2.1) zu Grunde.

Nach der Abtrennung der wässrigen DNA Phase von der chromosomalen DNA, Zelltrümmern und Proteinen wird ein Nucleospin-Säulchen mit dieser beladen. Durch die Bindung der Plasmid-DNA an die Silica-Matrix der Säulchen kommt es zu einem erhöhten Reinheitsgrad der präparierten DNA. Diese wird nach Waschen der Säulchen mit einem ethanolhaltigem Waschpuffer mittels Elutionspuffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$ von der Säule eluiert.

2.5.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA mit dem Nucleobond® AX 100-Kit

Diese Methode der DNA-Präparation wurde verwendet wenn eine größere Menge an Plasmid-DNA (Midi-Präparation) benötigt wurde bzw. ein „low copy“-Plasmid isoliert werden sollte. Im letzteren Falle liegen von diesem Plasmid nur wenige Kopienzahlen pro Zelle vor, so dass eine sehr geringe DNA-Ausbeute mit den anderen Präparationsmethoden zu erwarten war. Der Methode des Nucleobond® AX 100-Kit (Fa. Qiagen) liegt ebenfalls das Prinzip der alkalischen Lyse zu Grunde (s. 2.5.2.1). Das Aufreinigungsverfahren beruht dabei auf einem speziellen Anionenaustauscherharz. Die Isolierung der DNA erfolgte aus einer 100 ml ÜN-Kultur und wurde gemäß Hersteller-Protokoll durchgeführt.

2.5.3 DNA-Fällung

Zur Konzentrierung oder weiteren Reinigung von DNA in wässriger Phase wurde diese optional gefällt. Diese Methode fand ebenfalls Anwendung wenn ein reaktionsbedingter Pufferwechsel, aufgrund von eingeschränkter Enzymwirkung, notwendig war.

Die DNA-haltige Lösung wurde dafür mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 6.0) versetzt und dann entweder mit 2 Vol. 96% Ethanol oder 0,6 Vol. Isopropanol gemischt. Die Präzipitation mit Ethanol erfolgte für 1-2 h bei -20°C oder für 20 min bei -80°C . Bei der Fällung mit Isopropanol wurde der Ansatz für 15 min bei RT stehen gelassen. Die DNA wurde anschließend durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 16.000 g pelletiert und mit 70% Ethanol gewaschen (5min; 16.000 g). Nach dem Trocknen bei 37°C wurde das DNA-Pellet in TE-Puffer oder $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ resuspendiert.

2.5.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Quantifizierung der DNA-Konzentration in einer Probe erfolgte spektralphotometrisch (Sambrook *et al.*, 1989) mit dem Ultrospec 2100 pro UV/Visble Spectrophotometer (Fa. Pharmacia). Dabei entspricht eine Absorption von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml Probe.

Durch Bestimmung des Absorptionsquotienten aus 260 nm/280 nm konnte die Reinheit der isolierten DNA-Probe kontrolliert werden. Bei einer reinen DNA-Lösung liegt dieser bei 1,8. Treten Verunreinigungen wie z.B. durch Proteine (Absorptionsmaximum bei 280 nm) auf, erniedrigt sich der Quotient.

2.5.5 Spaltung der DNA durch Restriktionsendonukleasen

Zur sequenzspezifischen Spaltung der jeweiligen DNA wurden Restriktionsendonukleasen des Typs II verwendet. Sämtliche Restriktionsansätze in dieser Arbeit wurden im vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffer durchgeführt.

2.5.5.1 Spaltung chromosomaler DNA

Für die Restriktion genomischer DNA wurden Konzentrationen von 1-5 µg verwendet und mit 1 U Enzym/µg DNA versetzt. Das Reaktionsvolumen betrug dabei 10-20 µl. Der Restriktionsansatz wurde für 2-3 h bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Je nach weiterer Verwendung des Reaktionsansatzes wurde dieser entweder gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5.6) oder das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert und die DNA gefällt.

2.5.5.2 Spaltung von Plasmid-DNA

Für die Restriktion plasmidärer DNA wurden 0,2-1 µg DNA verwendet und mit 0,5-1 U Enzym/µg DNA versetzt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl. Die Restriktionsansätze wurden 1,5-2 h bei den optimalen Reaktionstemperaturen für das

jeweilige Enzym inkubiert. Ebenso wie bei Spaltungen von chromosomaler DNA wurde diese entweder gelelektrophoretisch aufgetrennt (s. 2.5.6) oder das Restriktionsenzym hitzeinaktiviert und die DNA gefällt.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Für die Auftrennung, Identifizierung und Isolierung einzelner DNA-Fragmente wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Mit dieser Methode (Sambrook *et al.*, 1989) werden DNA-Moleküle entsprechend ihrer Fragmentgröße in einer Matrix aus Agarose durch Anlegen eines elektrischen Feldes aufgetrennt.

Die Gele enthielten 0,5-1,2% Agarose und wurden durch Aufkochen in 1x TAE verflüssigt. Die Höhe der Agarose-Konzentration wurde abhängig von der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente gewählt. Für die Visualisierung der DNA wurde der verflüssigten Agarose nach Abkühlen 0,25 µg/ml Ethidiumbromid-Lösung (1% Stocklösung) zugemischt und in die Gelapparatur gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 Vol. des 6x DNA-Ladepuffers versetzt und in die Geltaschen mittels Pipette aufgetragen. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte entweder bei einer Spannung von 5 V/cm oder ÜN bei 1,5-2 V/cm Gellänge. Die Detektion der DNA erfolgte mit einem Transilluminator bei 312 nm, da das in die DNA interkalierte EtBr bei dieser Wellenlänge angeregt wird und fluoresziert. Über den Vergleich zu einem DNA-Größenstandard konnten die aufgetrennten Fragmente ihrer jeweiligen Größe zugeordnet werden. Die Gele konnten mit einer Videodokumentation fotografisch dokumentiert werden.

2.5.7 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Für die Extraktion bzw. Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden in dieser Arbeit zwei verschiedenen Kits benutzt. Bei Fragmenten mit einer Größe von 0,7-10 kb wurde das NucleoSpin® Extract-Kit verwendet. DNA-Fragmente < 0,5 kb bzw. > 10 kb wurden mit dem Genclean-Kit von Bio 101 Inc. extrahiert. Bei beiden

Methoden wurde das zu eluierende DNA-Fragment durch ein Skalpell aus dem Gel heraus-geschnitten und gemäß Herstellerprotokoll weiterverfahren.

Obwohl die Effizienz bei einer Aufreinigung von Fragmenten < 0,5 kb laut Produktanbietern sinken sollte, hat sich das Genclean-Kit als das wesentlich bessere Produkt erwiesen um kleine DNA-Fragmente in einer akzeptablen Konzentration aus einem Agarosegel aufzureinigen.

2.5.8 Dephosphorylierung von DNA

Um bei einer Klonierung die Religation des Vektors zu vermeiden, wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (SAP) behandelt. Das Enzym hydrolisiert die 5'-Phosphatgruppe der DNA, die bei katalytischen Reaktionen der DNA-Ligase benötigt wird. DNA-Moleküle, die auf diese Weise behandelt wurden, konnten daher keine Selbstligation mit ihrem gleichen 3'-OH-Ende eingehen. Die Dephosphorylierung fand nach Fällung (s. 2.5.3) der jeweiligen DNA statt, wobei das Reaktionsvolumen abhängig von der DNA-Menge eingestellt wurde. Dem jeweiligen Ansatz wurde eine entsprechende Menge 10x Puffer und 1 U AP zugesetzt. Nach 60 min Inkubation bei 37°C wurde erneut 1 µl AP in den Ansatz gemischt und wiederum 60 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms wurde der Reaktionsansatz für 15 min auf 65°C erhitzt. Zur vollständigen Entfernung der Proteine wurde der Ansatz entweder mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert oder über Nucleospin-Säulchen (s. 2.5.2.3) aufgereinigt.

2.5.9 Ligation von DNA

Für die Ligation von Insert- und Vektor-DNA wurde eine T4-DNA Ligase verwendet. Diese DNA-Ligase schließt in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen und unter Verbrauch von ATP die Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe an einem und der 3'-OH-Gruppe am anderen DNA-Ende.

Die eingesetzte Vektor-DNA wurde dafür nach durchgeführter (s. 2.5.5.2) Restriktion zunächst mit 1 Vol. Phenol/Chloroform extrahiert und zusätzlich gefällt (s. 2.5.3). Die

Insert-DNA wurde nach erfolgter Restriktion über eine Agarosegel aufgetrennt und das entsprechende Fragment extrahiert (s. 2.5.7). Bei einer Restriktion mit nur einer Restriktionsendonuclease wurde die Vektor-DNA zur Vermeidung einer Religation zusätzlich nach der Restriktion dephosphoryliert (s.2.5.8).

Für die Ligation wurde ein molares Verhältnis zwischen Vektor- und Insert-DNA von 1:3 gewählt, mit der entsprechenden Menge 5x Ligasepuffer vermischt und nach Zugabe von 1 U T4-DNA Ligase bei 16°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dem Reaktionsansatz wiederum 1 U T4-DNA Ligase zugesetzt und für weitere 4 h bei RT inkubiert. Dieser Ansatz wurde direkt zur Transformation von *E. coli* Zellen eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

2.5.10 Transformation von *E. coli* Zellen durch Elektroporation

2.5.10.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die Herstellung elektrokompetenter Zellen wurde nach der Methode von Shigekawa und Dower (1989) durchgeführt. Aus einer 10 ml Vorkultur wurde eine 500 ml Hauptkultur 1:10 angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bei 37°C inkubiert. Bei dieser optischen Dichte befindet sich die Bakterienkultur kurz vor dem Übergang in die stationäre Phase und die Zellen weisen eine hohe Vitalität auf. Die Kultur wurde dann für 15 min auf Eis inkubiert und die Zellen anschließend für 10 min bei 4°C (4000 rpm) in einer Sorvall RC-5B Kühlzentrifuge sedimentiert. Das Zellpellet wurde auf Eis in 250 ml vorgekühltem 10%igen Glycerin resuspendiert und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Das Waschen und Zentrifugieren der Zellen wurde erneut mit 50 ml 10%igem Glycerin wiederholt und das Zellpellet schließlich in 3 ml GYT-Puffer aufgenommen und in 50 µl Portionen aliquotiert. Diese Aliquots wurden dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.5.10.2 Elektrotransformation von *E. coli* Zellen

Für die Transformation eines *E. coli* Stammes wurde ein Aliquot elektrokompenter Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1-4 µl des jeweiligen Ligationsansatzes gemischt. Dieses Zell-DNA-Gemisch wurde in eine vorgekühlte Elektroporationskuvette (Fa. BIORAD, München) mit einer Spaltbreite von 0,1 cm überführt. Die Elektrottransformation wurde mit einem Gene PulserTM (Fa. BIORAD) unter den folgenden Bedingungen durchgeführt:

200 Ω; 25 µF; 1,25 kV

Die gemessene Zeitkonstante sollte bei diesen gewählten Elektroporationsbedingungen 4,0-4,5 msec betragen. Nach der Transformation wurde 1 ml LB-Medium in die Kuvette pipettiert und der Ansatz in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß passagiert. Für eine phänotypische Expression des jeweiligen Resistenzmarkers wurde die Probe 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1/100, 1/10 und der Rest des Ansatzes auf drei verschiedene LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotika plattiert und ÜN bei 37°C inkubiert.

2.5.11 Klonierung von PCR-Fragmenten mit dem TOPO TA Cloning[®]-Kit

Mit diesem Kit ist es möglich PCR-Fragmente direkt zu klonieren ohne einen komplementären Nucleotid-Überhang zu der Vektor-DNA aufzuweisen. Diese Überhänge sind für die Anlagerung von DNA-Fragmenten und eine folgende Ligation notwendig. DNA-Fragmente, die durch *Taq* DNA Polymerase mittels PCR amplifiziert wurden, besitzen am 3'-Ende einen matrizenunabhängigen A-Überhang. Dieser Überhang wird sich bei der Methode der TOPO-Klonierung zu nutze gemacht. Durch den 3'-T-Überhang am pCR[®] 2.1-TOPO Vektor (Shuman, 1994) kommt es zusammen mit dem 3'-A-Überhang des PCR-Amplifikats zu einer der Ligation ähnlichen Reaktion. Die 3'-Enden des Vektors sind über einen Phosphatrest kovalent mit der Topoisomerase I verbunden. Diese katalysiert den nucleophilen Angriff der 5'-OH-Gruppe des PCR-Amplifikats an den 3'-Phosphatrest des Vektors. Unter Ausbildung einer neuen Phosphodiesterbindung werden das PCR-Produkt und der Vektor kovalent verbunden.

2.5.11.1 Klonierung, Transformation und blau-weiß Selektion

Die Durchführung der Klonierung wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Zur Detektion der Transformanten wurde ein blau-weiß Screening durchgeführt.

Die Insertionsstelle des PCR-Fragments liegt innerhalb des lacZ α -Gens, das auf dem pCR[®] 2.1-TOPO Vektor codiert ist. Bei Religanden des Vektors ist das lacZ α -Gen vollständig und es wird die α -Untereinheit der β -Galactosidase expremiert. Dieses Enzym spaltet in die Zelle aufgenommenes X-Gal und es entsteht ein blauer Farbstoff, der die gesamte Kolonie einfärbt. Bei Insertion des PCR-Fragmentes in den Vektor kann die β -Galactosidase nicht expremiert werden und die Kolonien dieser Zellen bleiben auf den Agarplatten weiß. Diese transformierten Zellen enthalten die richtigen Plasmide und werden für weitere Versuche gepickt und in Antibiotika-haltigem Medium kultiviert bzw. konserviert.

2.5.12 Erstellen einer Cosmidbank

Für die Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters wurden aus den Myxobakterien *S. erecta* Pd e68 und *A. disciformis* An d48 Cosmidbanken angelegt. Die Methode wurde mit Hilfe des „Gigapacks[®] II XL Packaging Extract“ von der Fa. Stratagene durchgeführt (s. Tab. 2.1.2). Dazu wurde die chromosomale DNA in ca. 40 kb große DNA-Fragmente hydrolysiert und in den Supercos-Vektor ligiert. Eine Infektion der *E. coli* Zellen erfolgte nach einer *in vitro* Verpackung über λ -Phagen, wobei eine gesamte DNA-Bank von mehreren tausend Klonen entstand. Alle diese Klone enthalten einen Teilabschnitt der genomischen DNA, die zusammen das gesamte bakterielle Chromosom mehrfach abdecken. Da Myxobakterien ein sehr großes Genom von ca. 10 Mb besitzen, wurde eine Bank von 1920 Klonen erstellt, was etwa einer 8-fachen Abdeckung des Genoms entspricht.

Bei der Erstellung beider Cosmid-Banken wurde analog vorgegangen. Da die Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters im *A. disciformis* An d48 erfolgte, werden sich die folgenden Beschreibungen auf dieses Bakterium beziehen.

2.5.12.1 *Sau3A* Partial-Restriktion chromosomaler DNA aus *A. disciformis* An d48

Für die Generierung der Cosmid-Bank müssen die DNA-Fragmente der isolierten chromosomalen DNA eine Fragmentgröße zwischen 40-45 kb aufweisen. Nur diese Fragmente können in der folgenden *in vitro* Verpackung in die Phagen-Köpfe aufgenommen werden, da dies der Genomgröße und damit der maximalen Aufnahmekapazität der Phagen entspricht. Um die ca. 10 Mb umfassende, genomische DNA aus *A. disciformis* An d48 auf diese Fragmentgröße zu hydrolisieren, wurde eine Partial-Restriktion mit der Endonuclease *Sau3A* durchgeführt. Zur Verifizierung der Bedingungen wurden ca. 50 µg der isolierten DNA (s. 2.5.1.1) mit ansteigenden *Sau3A*-Konzentrationen für 1 h bei 37°C hydrolisiert. Die gewählten Enzymkonzentrationen betrugen 0,015 U; 0,03 U; 0,0625 U; 0,125 U; 0,25 U; 0,5 U und 1 U Enzym. Ein Aliquot der verschiedenen Restriktionsansätze wurde zusammen mit einem Größenstandard gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Fraktionen, in denen die DNA zum größten Teil als 40-50 kb große Fragmente vorlag, wurden vereinigt und für die weitere Erstellung der Bank verwendet. Zur Trennung der DNA von Pufferbestandteilen und dem Restriktionsenzym *Sau3A* wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt und die DNA in 90 µl H₂O_{dest.} resuspendiert. Um eine ungewollte Neuordnung (rearrangement) des Chromosoms bei der späteren Ligation zu vermeiden, wurde die hydrolisierte DNA anschließend mit insgesamt 30 U SAP versetzt und für insgesamt 2 h bei 37°C dephosphoryliert. Nach der Inaktivierung des Enzyms durch eine Inkubation für 15 min bei 75°C, konnte die DNA bei -20°C bis zum weiteren Gebrauch gelagert werden.

2.5.12.2 Ligation des partial hydrolisierten Chromosoms in den SuperCos-Vektor

Aus 2 x 5 ml *E. coli* XL1Blue wurde der SuperCos Vektor unter Verwendung des Nucleospin® Plasmid-Kits (s. Tab. 2.1.2) nach Herstellerprotokoll isoliert. Zur Linearisierung wurden 50 µl des isolierten Vektors mit 10 U *Xba*I für 3,5 h bei 37°C hydrolisiert. Nach Entsalzen des Restriktionsansatzes mittels eines Microspin-Säulchens (Fa. Pharmacia) wurde dieser mit 20 U SAP dephosphoryliert und das Enzym bei 75°C für 25 min hitzeinaktiviert. Danach wurde die linearisierte Vektor-DNA mit Phenol/

Chloroform extrahiert und wiederum in 90 µl H₂O_{dest.} resuspendiert. Nun folgte eine weitere Hydrolyse mit 5 U *Bam*HI für 3,5 h bei 37°C. Die vollständige Restriktion des Vektors mit *Bam*HI konnte durch eine gelelektrophoretische Auftrennung des Restvektors von einem ca. 1 kb entstehenden Fragments beobachtet werden. In diesem Restriktionsansatz lagen die cohäsiven Enden des präparierten Supercos für die folgende Ligation frei vor und der gesamte Ansatz wurde mit der *Sau*3A hydrolisierten chromosomalen DNA (s. 2.5.12.1) vereinigt. Die vereinigten myxobakteriellen- und Cosmid-DNA-Fragmente wurden anschließend gemeinsam ethanolisch gefällt, mit 70% Ethanol gewaschen und bei 50°C getrocknet. Das DNA-Sediment wurde in 15 µl H₂O aufgenommen, mit 4 µl 5x T4 DNA-Ligasepuffer und 5 U T4 DNA-Ligase versetzt und bei 16 °C ÜN inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Ansatz erneut mit 5 U Ligase versetzt und für 4 h bei RT inkubiert. Da der Ligase-Puffer PEG enthält, das störend auf die folgende Verpackungsreaktion wirkt, wurde der gesamte Ligationsansatz gefällt (s. 2.5.3) Die Ligation wurde danach bis zur Verpackung bei -20 °C gelagert.

2.5.12.3 *In vitro* Verpackung der Cosmide in λ-Bakteriophagen

Die ligierte DNA wurde mit dem Gigapack®II XL Packaging Extract (Fa. Stratagene) gemäß dem Herstellerprotokoll in Phagenprotein verpackt. Dafür wurde der Extrakt nach dem Auftauen mit 4 µl des Ligationsansatzes versetzt und für 1,5 h bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl SM-Puffer (s. Tab. 2.1.3) und 20 µl Chloroform wurde bei 8.000 g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und konnte zur Bestimmung des Phagentiters bzw. Transduktion eingesetzt werden.

2.5.12.4 Bestimmung des Phagentiters und Transfektion von *E. coli* SURE-Zellen

Durch die Partialrestriktion des Chromosoms entstehen neben den gewünschten Fragmentgrößen von 40 - 45 kb auch solche, die sowohl geringer als auch größer sind. Ein „Aussortieren“ dieser Fragmente geschieht erst während der *in vitro* Verpackung

(s. 2.5.12.1). Bei dieser Reaktion werden nur 40 - 50 kb große Cosmide im Phagenkopf verpackt. Diese Bakteriophagen sind infektiös und können zur Generierung der DNA-Bank eingesetzt werden. Cosmide die in ihrer Gesamtgröße kleiner oder größer sind werden in den Phagenkopf transportiert, aber der weitere Zusammenbau der Bakteriophagen bricht ab. Um die Anzahl der infektiösen Bakteriophagen im Verpackungsansatz zu bestimmen, wurden 1:100, 1:250 und 1:500 Verdünnungen des Verpackungsansatzes mit SM-Puffer hergestellt. 25 µl dieser Verdünnungen wurden mit 25 µl einer *E. coli* SURE Kultur, (angezogen in LB-Medium + 10 mM MgSO₄ und 0,2% Maltose bis OD₆₀₀ von 0,8) vermischt und bei RT für 30 min inkubiert. 200 µl LB-Medium wurden anschließend zugegeben und für 45 min bei 37°C inkubiert. Die Ansätze wurden danach auf LB-Agar, versetzt mit 50 µg/ml Ampicillin, plattiert und ÜN bei 30°C inkubiert. Die aus der Infektion resultierten Kolonien wurden letztlich gezählt und mit der eingesetzten Menge Verpackungsansatz verglichen. Für die Generierung der Cosmidbank aus *A. disciformis* An d48 wurde ein Phagentiter von 75.200 Bakteriophagen/ml Verpackungsextrakt bestimmt.

Um sicher gehen zu können, dass eine Cosmidbank mit achtfacher Abdeckung des Genoms erreicht werden konnte (entspricht ca. 2000 Klonen), wurden 70 µl des Verpackungsextraktes zur Infektion einer ÜN *E. coli* SURE-Kultur verwendet. Die 70 µl Verpackungsextrakt wurden mit 630 µl SM-Puffer aufgestockt und mit insgesamt 700 µl der *E. coli* Kultur vermischt. Nach der gleichen Prozedur wie oben beschrieben wurde der gesamte Ansatz auf Nunc-Schalen (LB-Agar + 50 µg/ml Ampicillin) plattiert und bei 30°C ÜN inkubiert. Insgesamt wurden am nächsten Tag 1920 Klone mit sterilen Zahnstochern gepickt und in 20 96'er Mikrotiterplatten transferiert. Jede Vertiefung dieser Platten enthielt 130 µl LB/Amp⁵⁰ und wurde mit je einer Kolonie inokuliert. Nach einer ÜN Inkubation der Platten bei 30°C wurde das Medium mit Glycerol versetzt und bei -80°C gelagert.

2.5.12.5 Herstellung einer Membran-Kopie der Cosmidbank

Für eine spätere Suche nach einem Cosmid, das eine spezifische Sequenz des bakteriellen Genoms trägt, wurde ein Abklatsch der gesamten Bank auf Nylonmembranen (Biodyne B, Pall) gemacht. Dadurch konnten Cosmide mittels einer

Koloniehybridisierung (s. 2.5.14.4) schnell identifiziert und aus der Originalbank isoliert und kultiviert werden. Von der Cosmidbank wurde, bevor sie bei -80°C konserviert wurde, mittels 96er-Stempels und einer Rasterschablone ein Duplikat erstellt. Nach einer Inkubation ÜN bei 30°C entstand somit eine Vorlage der gesamten Bank, die als Matrice für einen Filterabzug diente. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 6°C wurden Nylonmembranen auf den Innendurchmesser der Agarplatten zugeschnitten. Je ein Whatman-Filterpapier (Whatman 3MM) wurde mit Denaturierungslösung 2, Neutralisierungslösung 2 und 2xSSC (s. 2.1.2.1) zur Vorbereitung getränkt und zusätzlich eine Proteinase K-Lösung (s. 2.1.1) vorbereitet. Die zurechtgeschnittene Nylonmembran wurde trocken auf die noch kalten mit *E. coli* Sure inokulierten LB-Agarplatten für 1 min gelegt. Anschließend wurde der Filter vorsichtig und in einer durchgehenden Bewegung von den Platten abgezogen. Mit den auf der Membran vorhandenen Kolonie-Abklatschen wurde der Filter auf das Whatman-Papier mit Denaturierungslösung 2 gelegt und 15 min inkubiert. Bei der Inkubation auf den jeweilig durchtränkten Whatman-Papieren war darauf zu achten, dass keine Flüssigkeit auf die Oberseite der Membranen gelang. Dies hätte eine Durchmischung der Kolonien und damit eine Verfälschung der Cosmidbank zur Folge gehabt. Die Nylonmembran wurde anschließend auf die Neutralisierungslösung 2 transferiert und für weitere 15 min inkubiert. Nach einer weiteren 15 minütigen Inkubation auf mit 2xSSC getränktem Whatman-Papier konnte die Nylonmembran schließlich mit 15 ml einer Proteinase K-Lösung versetzt werden und 1 h bei 55°C inkubiert werden. Durch 2 stündiges Backen bei 80°C wurde die DNA auf der Nylon-Membran fixiert.

2.5.13 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Oligonucleotid-Primer werden im Überschuß, zusammen mit einer thermostabilen DNA-Polymerase, zu einer DNA-Probe gegeben. Ein Zyklus der PCR lässt sich in drei Schritte trennen:

1. Denaturierung: Die DNA-Stränge werden durch Erhitzen auf 95°C denaturiert und liegen als Einzelstränge im Reaktionsgefäß vor.

2. Hybridisierung (annealing) der Oligonucleotid-Primer: Die Temperatur wird knapp unter der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer gesenkt. Dadurch kommt es zu einer stringenten Anlagerung der Primer an die komplementären Abschnitte der einzelsträngigen Matrizen-DNA.
3. Extension: Die DNA-Polymerase heftet Nucleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert in 5'-3' Richtung den komplementären Strang. Dieser Synthese-Schritt läuft bei optimaler Temperatur der jeweiligen DNA-Polymerase ab (meist 70°C).

2.5.13.1 Standardprotokoll einer PCR-Amplifikation

Im folgenden ist ein Protokoll angegeben, das in dieser Arbeit standardmäßig für die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten verwendet wurde.

<u>Reaktionsansatz:</u>	DNA-Porbe	40 ng
	MGCL ₂ (25 MM)	2,5 µL
	10 x PCR-Puffer	2,5 µl
	DMSO (100%)	1,25 µl
	dNTP's (1,25mM pro NTP)	4 µl
	Primer I (50 pmol / µl)	0,25 µl
	Primer II (50 pmol / µl)	0,25 µl
	H ₂ O _{dest}	<u> x µl </u>
		24,9 µl

Dieser Reaktionsansatz wurde in 0,2 ml Reaktionsgefäße zusammen pipettiert und in den Thermoblock der PCR-Anlage (Mastercycler Gradienten; Fa. Eppendorf) gestellt. Der Ansatz wurde 5 min bei 95°C erhitzt und dann 1 U Taq Polymerase dem Reaktionsgefäß zugemischt. Die gesamte PCR-Reaktion durchlief standardmäßig 30 Zyklen.

Bei der Berechnung bzw. Wahl der Hybridisierungstemperatur einer PCR wurde folgende Formel mit einbezogen, wobei T_M der Schmelzpunkt und n die Anzahl der Nucleotid des des jeweiligen Primers sind:

$$T_M = 69,9 + 0,41 \times [\text{GC}\%] - 650/n$$

Vom niedrigeren T_M des Oligonucleotid-Primers eines PCR-Primerpärchen ausgehend, wurden nochmals 2°C abgezogen und als Annealing-Temperatur gewählt. Die optimale Bindetemperatur eines Primerpärchens konnte gegebenenfalls durch Hilfe eines Temperaturgradienten ermittelt werden.

2.5.13.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Von jeder PCR wurden 2-5 µl mittels gelelektrophoretischer Auftrennung qualitativ überprüft. Falls keine Nebenbanden bzw. unspezifischen Produkte während einer Reaktion entstanden waren, wurde der PCR-Ansatz mit dem Nucleospin® Extract - Kit (Fa. Macherey-Nagel) von Puffersalzen, DNA-Polymerase, Primern und dNTPs laut Herstellerprotokoll gereinigt. Diese DNA-Fragmente konnten direkt für weitere Versuche eingesetzt werden. Wurden unspezifische Nebenprodukte bei einer PCR gebildet, wurde das entsprechende Amplifikat mit einem Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und extrahiert. Für diese Gelextraktion wurde ebenfalls das Nucleospin® Extract-Kit verwendet und laut Protokoll durchgeführt.

2.5.14 Southern-Blot

Mit dieser Methode, die 1975 von E.M. Southern entwickelt wurde, können spezifische DNA-Sequenzen innerhalb chromosomaler DNA identifiziert werden. Durch einen Transfer der DNA-Fragmente aus einem Elektrophoresegel auf eine Membran, kann dabei eine genaue Größenbestimmung des identifizierten Fragments, auf dem sich die gesuchte DNA-Sequenz befindet, durchgeführt werden.

2.5.14.1 Vakkumblot

Die genomische DNA wurde wie unter 2.5.1 beschrieben isoliert und nach entsprechender Spaltung (s. 2.5.5.1) gelelektrophoretisch (s. 2.5.6) aufgetrennt. Nach Dokumentation des Gels wurde es 10 min in 0,25 N HCl bei RT vorsichtig geschüttelt, um durch eine Depurinierung Strangbrüche in der DNA zu induzieren. Diese niedermolekularen DNA-Fragmente lassen sich beim späteren „Blotten“ leichter auf die Membran transferieren. Das Gel wurde kurz mit H₂O_{deion.} gespült und anschließend zweimal für 15 min in Denaturierungslösung 1 inkubiert. Nach erneutem Spülen mit H₂O_{deion.} wurde das Gel zweimal für 15 min in Neutralisierungslösung 1 inkubiert. Nach dieser Vorbehandlung des Agarosegels wurde die DNA mittels Vakuumblot auf eine Nylomembran der Fa. Pall transferiert.

Dazu wurde zunächst eine Membran in exakter Gelgröße auf ein mit 10x SSC getränktes Whatman-Papier gelegt. Danach wurde eine passend geschnittene Blende aus Plastikfolie aufgelegt und im Vakuumblotter (Modell 785; Fa. Biorad) fest gespannt. Zuletzt wird das Gel luftblasenfrei aufgelegt und ein Unterdruck von 5 mm Hg aufgebaut. Durch ein Beschichten des Gels mit 10xSSC wird die DNA mit der Salzlösung auf die Membran transferiert. Der Vakuumblot wird 1,5 h durchgeführt und anschließend die DNA durch 8 minütiges UV-Crosslinking (312 nm) auf der Membran fixiert.

2.5.14.2 Sondenmarkierung

Für die Präparation einer Sonde wurde der DIG-High-Prime-Mix der Fa. Roche Diagnostics verwendet. Die Herstellung der DIG-makierten DNA-Fragmente wurde gemäß Herstellerprotokoll durchgeführt. Ein Reaktionsansatz von 16 µl DNA (1-1,5 µg DNA) und 4 µl DIG High Prime Mix wurde zusammen pipettiert und für 20 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,2 M EDTA (pH 8,0) und / oder 10 minütiger Hitzeinaktivierung bei 65°C abgestoppt. Die markierte Sonde konnte bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert werden.

2.5.14.3 Hybridisierung und Detektion

Bei den Hybridisierungsexperimenten und der Detektion der gesuchten DNA-Fragmente wurde sich an das Protokoll des DIG-Systems der Fa. Roche Diagnostics gehalten. Nachdem die hydrolysierte DNA-Probe mittels Vakuumblot auf einer Nitrocellulosemembran fixiert wurde, konnte diese in Hybridisierungslösung (s. Tab. 2.1.3) für 1-2 h inkubiert (Prähybridisierung) werden. Danach wurde frische Hybridisierungslösung (1 ml/10 cm²) auf die Membran gegeben und mit der jeweiligen Sonde, die vorher durch 10 minütiges Erhitzen bei 95°C denaturiert wurde, versetzt. Die Hybridisierung wurde ÜN bei 38-42°C durchgeführt. Die Prä- bzw. Hybridisierung und folgende Detektionsschritte wurden in einem Hybridisierungssofen durchgeführt.

Die mit der jeweiligen Sonde hybridisierten DNA-Fragmente wurden durch eine Chemolumineszenz-Reaktion auf einem Röntgenfilm detektiert. Hierzu wurde die Membran mit Fab-Fragmenten eines polyklonalen Schaf-Anti-Digoxigenin inkubiert. Die an den Antikörpern gekoppelte alkalische Phosphatase spaltet CDP®, so dass es beim Zerfall des Substrates zu einer Lichtemission kommt, die auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Im Folgenden werden die einzelnen Schritte bis zur endgültigen Detektion angegeben. Die Membran wurde zunächst 2x5 min bei RT in 2x SSC-Puffer gewaschen und anschließend 2x15 min bei 58-68°C in 0,5x SSC-Puffer. Bei letzteren Waschschritten wird durch Erhöhung der Temperatur die Stringenz der DNA-DNA Bindung erhöht und unspezifisch gebundene DNA abgewaschen. Nachdem äquilibrieren der Membran in Maleinsäure-Puffer wurde diese für 30-60 min in Blockierungslösung inkubiert. Nach 30 minütiger Inkubation in Anti-DIG-AP-Lösung (1:10.000 verdünnter Antikörper in Blockierungslösung) und Waschen mit Maleinsäurepuffer+Tween®20 (2x15 min) wurde die Membran 5 min in Detektionspuffer äquilibriert. Anschließend wurde die Membran mit CDP-Star-Lösung beschichtet (1 ml/100 cm²), für 5 min bei RT inkubiert und in Folie eingeschweißt. Die chemoluminiszierende Membran wurde auf einem Röntgenfilm aufgelegt und in einer Expositionskassette verschlossen. Je nach Signalstärke wurde der Film für 5-30 min exponiert. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte mittels der Entwicklermaschine Curix 60 der Fa. AGFA.

2.5.14.4 Koloniehybridisierung

Die Hybridisierung der Membrankopien der Cosmidbank verlief ebenfalls wie unter 2.5.14.3 beschrieben wurde. Dabei wurden je zwei Membranen pro Hybridisierungsröhrchen inkubiert, um eine Ausdünnung der Sonde und damit schwächere Signale bei der Detektion zu vermeiden. Bei der Identifizierung der richtigen Klone nach erfolgter Detektion ist darauf zu achten, dass die Anordnung der Cosmide auf den Membranen spiegelverkehrt zur Original-Cosmidbank liegen.

2.5.15 Transformation von Myxobakterien durch Elektroporation

In dieser Arbeit wurden sämtliche Transformationen von Myxobakterien mit Fremd-DNA mit Hilfe der Elektroporation durchgeführt. Bei dieser Methode treten durch das Anlegen einer großen Spannung Risse bzw. Löcher in der Außenmembran der Bakterienzelle auf, durch die Fremd-DNA in die Zellen aufgenommen werden kann. Für eine Elektrotransformation des *A. disciformis* An d48 wurden zwei verschiedene Protokolle verwendet. Diese Protokolle wurden für die Myxobakterien *Stigmatella aurantiaca* (Beyer *et al.*, 1999) und *Myxococcus xanthus* (Kashefi & Hartzell, 1995) etabliert. Die beiden Methoden zeigten in der Transformationseffizienz des *A. disciformis* An d48 keinen Unterschied, so dass die Elektrotransformation zur Erstellung einer *Himar1* vermittelten Transposon-Mutantenbank nach dem Protokoll für *Stigmatella aurantiaca* durchgeführt wurde. Ebenso erfolgte die Transformation der anderen myxobakteriellen Tubulysin-Produzenten (s. Tab. 2.2.1) nach dem von Beyer *et al.* eingeführten Protokoll. Im Folgenden sind die beiden Protokolle aufgeführt.

2.5.15.1 Elektrotransformation von *A. disciformis* An d48 nach Beyer *et al.* 1999

Eine 50 ml *A. disciformis* Kultur (in Trypton-Medium) wurde aus einer Vorkultur 1:20 angeimpft und ÜN bei 30°C bis zu einer Zelldichte von $1-2 \cdot 10^8$ Zellen/ml kultiviert. Danach wurde die Kultur bei 20°C abzentrifugiert (20 min; 4000rpm) und die Zellen im gleichen Volumen Waschpuffer (5 mM HEPES/NaOH, 0,5 mM CaCl_2 ; pH 7,2)

resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 25 ml Waschpuffer resuspendiert und erneut abzentrifugiert. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wurde die absolute Zellzahl innerhalb der 25 ml Zellsuspension mikroskopisch bestimmt, so dass rechnerisch $1 \cdot 10^9$ Zellen/40 μ l Waschpuffer resuspendiert wurden. Durch diese Prozedur wurden die Bakterien von Salzen und Medienbestandteile gereinigt und konnten für die Elektrottransformation eingesetzt werden. Insgesamt konnten auf diese Weise aus 50 ml Kultur 5-10 Aliquots an elektrokompenten Myxobakterien gereinigt werden.

Elektroporationsbedingungen:

1-3 μ g DNA wurden mit 40 μ l Zellsuspension gemischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) gegeben. Die Elektroporation wurde unter Standardbedingungen für *S. aurantiaca* bei 200 Ω , 25 μ F und 0,85 kV/cm durchgeführt.

Direkt nach der Elektroporation wurde die Zellsuspension in 1 ml Trypton-Medium aufgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Transfer in 50 ml Trypton-Medium werden die Zellen für eine phänotypische Expression 6 h bei 30°C inkubiert. Danach wird die Kultur abzentrifugiert (20 min, 4000 rpm, 20°C) und wiederum in 1 ml Trypton resuspendiert. Ausgehend von einer 100%-igen Überlebensrate der Zellen nach der Elektroporation wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^4$ Zellen mit 3 ml Trypton-Softagar auf Kanamycin-haltigen (50 μ g/ml) Trypton-Platten ausgebracht. Diese Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach 5-8 Tagen waren erste Klone zu sehen.

2.5.15.2 Elektrottransformation von *A. disciformis* An d48 nach Kashefi & Hartzell

Die Wachstumsbedingungen der Kulturen sowie Zentrifugationen und das abschließende Einengen der Zellzahl wurden genauso durchgeführt wie unter 2.5.15.1 beschrieben ist. Dies ist abweichend vom Standardprotokoll für *Myxococcus xanthus* (Kashefi & Hartzell, 1995) optimiert worden.

Elektroporationsbedingungen:

1-3 µg DNA wurden mit 40 µl Zellsuspension gemischt und in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette (0,1 cm) gegeben. Die Elektroporation wurde bei 400 Ω, 25 µF und 0,65kV/cm durchgeführt. Direkt nach der Elektroporation wurde 1 ml Trypton-Medium zugegeben und in einem 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß für 6 h bei 30°C inkubiert. Ausgehend von einer 100%igen Überlebensrate der Zellen wurde eine Verdünnungsreihe erstellt und $1 \cdot 10^8$ - $1 \cdot 10^4$ Zellen mit 3 ml Trypton-Softagar auf Kanamycin haltigen (50 µg/ml) Trypton-Platten plattiert. Diese Platten wurden bei 30°C inkubiert und nach 5-8 Tagen waren die ersten Klone zu sehen.

2.5.16 Generierung einer *HimarI* vermittelten Transposon-Mutantenbank von *A. disciformis* An d48 durch Elektrotransformation

Da das pMycoMar für eine *in vivo* Mutagenese von Mycobakterien konstruiert wurde, musste die Transformationseffizienz im An d48 bestimmt werden, um zeigen zu können, ob dieser Myxobakterien-Stamm grundsätzlich durch dieses Transpositionssystem genetisch manipulierbar war. Des weiteren wurde als Kontrollstamm *Myxococcus xanthus* verwendet, für den eine Transformation bereits erfolgreich gezeigt wurde (H. Kaplan; pers. Mitteilung).

Der Gentransfer des pMycoMar wurde für beide Stämme nach den oben beschriebenen Methoden durchgeführt (s. 2.5.15.1 und 2.5.15.2). Für die Bestimmung der Mutagenese-Effizienz des Transposons wurde parallel zu jedem Transformationsansatz die gleiche Zellzahl mit Wasser elektroporiert, um eine Spontanmutationsrate bestimmen zu können. Nach einer Inkubationszeit von 8-10 Tagen bei 30°C wurde die absolute Transformations-Effizienz beider Stämme bestimmt.

Für die Generierung einer Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 wurden fünf Transformationsansätze mit je 2 µg pMycoMar versetzt und elektroporiert (s. 2.5.15.1). Die Ansätze wurden nach Ausplattieren mittels Softagar für 8-10 Tage inkubiert und insgesamt 1200 Klone gepickt. Die Kultivierung der Klone in Mikrotiterplatten ist unter 2.4.2.2.1 beschrieben. Die Extrakte (s. 2.4.3.2) der einzelnen

Mutanten wurden mittels biologischen Assay (s. 2.5.22.2) und HPLC-Analyse (s. 2.5.22.1) auf auffällige Phänotypen untersucht.

2.5.17 „Transposon-recovery“

Um Informationen zu erhalten, in welchem Bereich des Genoms das *HimarI* Element transponiert ist, wurde ein „Transposon-recovery“ durchgeführt. Bei dieser Methodik wird die chromosomale DNA der jeweiligen Mutante mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, die nicht innerhalb der bekannten *magellan4* Sequenz schneiden. Die restringierte DNA wird ligiert und nach Transformation in DH5 α / λ pir-Zellen auf Kanamycin-haltigen LB-Platten bei 37°C inkubiert. Auf diesen Platten können nur solche *E.coli* Zellen wachsen, die ein Plasmid mit dem *magellan4* und somit dem Tn5 Kanamycin-Resistenzgen enthalten. Solch ein Plasmid enthält an den Enden des Transposons chromosomale DNA aus *A. disciformis* An d48. Diese Plasmide können in den *E.coli* Zellen DH5 α / λ pir replizieren, da innerhalb der Transposonsequenz der oriR6K sitzt. Das Transposon wurde so aus dem jeweiligen Genom isoliert und mit den Primern K388 und K389 ansequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann gegen die Genbank auf Homologien zu bekannten Genen hin untersucht.

Das Isolieren der chromosomalen DNA wurde nach Standardprotokoll (s.2.5.1.1) aus 50 ml Kulturen jeder *A. disciformis* An d48 Mutante durchgeführt. Von dieser DNA wurden 5 μ g für die folgende Ausklonierung des Transposons verwendet, indem zunächst eine Restriktion durchgeführt wurde. Dabei wurden die Enzyme *NotI* und *BamHI* verwendet, die keine Restriktionsstelle innerhalb des *magellan4* haben und statistisch relativ häufig in GC-reicher DNA schneiden sollten.

Restriktionsansatz der genomischen DNA mit *NotI* bzw. *BamHI*:

5 µg DNA
+ 3 µl 10 x NEB Puffer
+ 0,3 µl 100 x BSA
+ 10 U Restriktionsenzym (*BamHI* bzw. *NotI*)
+ x µl dest. H₂O
30 µl Ansatz

Dieser Ansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von weiteren 10 U Enzym wiederum für 2 h zu 37°C gestellt.

Fällen der restringierten DNA und folgende Ligation

Der gesamte Restriktionsansatz von 30 µl wurde mit 1 Vol. Chloroform/Phenol versetzt und für 10 min zentrifugiert (13.200 rpm; 20°C). Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefällt (s. 2.5.3). Für die anschließende Ligation wurde das DNA-Pellet in 15 µl H₂O_{dest.} aufgenommen und vollständig eingesetzt.

Ligationsansatz: 15 µl DNA
+ 4 µl 5 x Ligasepuffer
+ 1 µl T4-DNA Ligase
20 µl Ansatz

Die Ligation wurde ÜN bei 16 °C inkubiert und am folgenden Tag wiederum 1 µl T4-DNA Ligase (5 U) hinzugegeben. Nach Zugabe der Ligase wurde der Ansatz wiederum ÜN bei 16 °C oder 4 h bei RT inkubiert.

Elektrotransformation der Ligationsansätze in den *E. coli* Stamm DH5α-λpir

1-3 µl der Ligationsansätze wurden mit 50 µl elektrokompenter DH5α-λpir Zellen gemischt und wie unter 2.5.10 beschrieben wurde mittels Elektroporation transformiert.

Danach wurden die Zellsuspensionen auf kanamycinhaltigen (50 µg/ml) LB-Platten ausplattiert. Nach einem Tag Inkubation bei 37°C wurden die Klone gepickt. Dabei konnten nur Zellen anwachsen, die ein Transposon-Plasmid beinhalten und damit eine Tn5-Kan^R vermittelte Resistenz besaßen.

2.5.18 *In vivo* Transposition mit EZ::TNTM <KAN-2> Tnp TransposomeTM Kit

Das EZ::TN Transposome wurde zur *in vivo* Mutagenese verschiedener Myxobakterien eingesetzt. Die Transformation der Bakterienzellen wurde wie unter 2.5.15.1 beschrieben mittels Elektroporation durchgeführt. Für jede Elektrotransformation wurden das laut Herstellerprotokoll angegebene Volumen von 1 µl Transposon (20 ng DNA) eingesetzt.

2.5.19 *In vitro* Transposition mit GPS-1 Genome Priming System

Durch das GPS-1 System wurde mittels einer Tn7 basierenden *in vitro* Transposition ein 12 kb großes, auskloniertes Fragment sequenziert. Bei diesem Kit wird eine TnsABC Transposase verwendet, die das Transposon (TransprimerTM) zufällig in die Zielsequenz inseriert. Durch spezifische Sequenzierprimer (PrimerN und PrimerS), die aus den flankierenden Enden des Transposons „herauslesen“, können die anliegenden Bereiche des DNA-Inserts sequenziert werden. Da das Transposon zufällig in die Zielsequenz inseriert wird, kann durch Sequenzieren einer bestimmten Anzahl generierter Transposon-Mutanten die gesamte Zielsequenz charakterisiert werden.

Bei der Durchführung der *in vitro* Transposition wurde sich an das Herstellerprotokoll gehalten. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

2 µl	10 GPS 10 x Puffer
+	1 µl pGPS 1.1 (vermittelt Kan ^r)
+	0,2 µl Ziel-DNA (entsprechen 80 ng)
+	<u>14,8 µl H₂O_{dest.}</u>
	18 µl Ansatz

Dieser Ansatz wurde gut durchmischt und mit 1 µl TnsABC Transposase versetzt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert, damit sich die Transposase vor der eigentlichen Reaktion im Reaktionsansatz vermischt. Nach der Zugabe von 1 µl „start solution“ wurde der Reaktionsansatz für eine Stunde bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit kommt es zum Strangtransfer des Transposons in die Ziel-DNA. Danach wurde die Reaktion durch Inkubation für 10 min bei 75°C abgestoppt. Von diesem Ansatz wurden 2 µl in *E.coli* XL-1 Blue transformiert und auf Kanamycin-haltigem Medium ausplattiert. Insgesamt sind ca. 2000 Klone nach einer Inkubation ÜN bei 37°C gewachsen.

Von diesen Klonen wurden 20 daraufhin überprüft, in welchem Verhältnis das Transposon in das Insert oder den Vektor inseriert ist. Dafür wurden diese Klone in einem Doppelrestriktionsansatz mit den Endonukleasen *Eco*RI und *Hind*III hydrolisiert. Die Restriktionsanalyse ergab, dass bei 75% der Klone das Transposon ins Insert inseriert war. Somit wurden 192 Klone sequenziert, wodurch eine ca. 12 fache Abdeckung der Sequenz zu erwarten war (bei 500 bp Lauflänge je Sequenzierung).

2.5.20 Sequenzierung von DNA

Das Prinzip der Sequenzierung erfolgte nach dem Didesoxy-Verfahren (Sanger *et al.*, 1977). Alle Sequenzanalysen wurden von der Abteilung für Genomanalyse an der GBF in Braunschweig durchgeführt. Als Matrize diente stets Plasmid-DNA. Die Sequenzierreaktion wurde unter Verwendung des „DYEnamic™ET terminator cycle sequencing Kits“ (Amersham Pharmacia Biotech) und den Primern UPO/PRO (MWG-Biotech) laut Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.5.21 Auswertung von DNA-Sequenzen

Die Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programmpaketes „DNASTAR“ (DNASTAR, London UK) ausgewertet. Weitere Programme, die für Sequenzvergleiche und Homologiesuchen verwendet wurden, konnten über das Internet benutzt werden und sind im Folgenden aufgeführt:

„BlastX“	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
„CLUSTALW“	http://www.tokyo-center.genome.ad.jp/SIT/CLUSTALW.html
„FASTA3“	http://www2.ebi.ac.uk/fasta3/.html
„NPBIOGENE“	http://www.npbio gene.com/
„NRPS“	http://www.jhunx.hcf.jhu.edu/~ravel/nrps

2.5.22 Methoden zur Analytik von Sekundärmetaboliten

Zur Analyse der Produktion von Sekundärmetaboliten wurden die jeweiligen Bakterienstämme bzw. Mutanten in 50 ml Produktionsmedium kultiviert (s. 2.4.2) und anschließend Extrakte gewonnen (s. 2.4.3). Zur Analyse wurden sowohl biologische als auch chemische Methoden verwendet, die im Folgenden aufgeführt sind.

2.5.22.1 Chemischer Nachweis von Sekundärmetaboliten durch HPLC-Analyse

Zum Nachweis von Myxothiazol und Angiolam in den jeweiligen Extrakten wurde eine DAD-gekoppelte HPLC Series 1100 (High Performance Liquid Chromatography) von der Fa. Hewlett Packard verwendet. Diese Bestimmung mittels HPLC war möglich, da Myxothiazol eine hohe UV-Lichtabsorption besitzt.

Das Prinzip zur Trennung von Substanzgemischen beruht auf den unterschiedlichen hydrophoben Wechselwirkungen der Analyten mit der Matrix. Im verwendeten *Reversed-Phase* Modus dient chemisch modifiziertes Kieselgel als stationäre, hydrophobe Phase, auf dessen Oberfläche C18-Gruppen kovalent gebunden sind. Eine polare Flüssigkeit, in diesem Falle ein Acetonitril/Methanol-Gemisch, stellt die mobile Phase dar. Beim Anlegen des linearen Gradienten wird im Laufe einer Trennung der Anteil der apolaren Komponente (Methanol) in der mobilen Phase kontinuierlich erhöht, so dass es zur schrittweisen Elution der über hydrophobe Wechselwirkungen gebundenen Substrate kommt.

Zur Identifizierung des Myxothiazols wurden 20 µl der Proben auf eine HPLC-Säule (Nucleosil 120-3 C₁₈, 2 mm x 125 mm, Macherey-Nagel, Düren) injiziert und mit einer Flussrate von 0,5 ml/min chromatographiert. Das Elutionsprofil wurde mit einem Diodenarray-Detektor (DAD) bei einer Wellenlänge von 200-400 nm aufgenommen. Die verwendeten Gradienten zur Auftrennung der Proben sind in den folgenden Tabellen zu sehen.

Tab. 2.5.1: Gradientenparameter eines HPLC-Laufes-Trennsystem 1 für die HPLC Analyse. Verwendete Fließmittel waren (A) 0,2% Essigsäure und (B) Acetonitril. Unter diesen Bedingungen besitzt Myxothiazol eine Retentionszeit von ca. 11 min.

Laufzeit [min]	Anteil an Fließmittel B [in %]
0	50
5	50
15	80
16	80

Tab. 2.5.2: Gradientenparameter eines HPLC-Laufes - Trennsystem 2 für die HPLC Analyse. Verwendete Fließmittel waren (A) 45% Methanol und (B) 100% Methanol. Unter diesen Bedingungen besitzt Myxothiazol eine Retentionszeit von ca. 31 min.

Laufzeit [min]	Anteil an Fließmittel B [in %]
0 – 6	0
7 – 20	0 → 45
21 – 26	45
27 – 40	45 → 81,8
40 – 50	81,8

2.5.22.2 Biologischer Assay zum Nachweis von Tubulysin (Cytotoxizitätstest)

Für den Nachweis von Tubulysinen in Zellextrakten wurde von Florenz Sasse (Sasse *et al.*, 2000) ein biologischer Assay entwickelt. Mittels diesem Cytotoxizitätstests war es in dieser Arbeit möglich Tubulysine in Extrakten aus nur 200 µl Kulturen (Mikrotiterplatten) nachzuweisen. Die folgende Beschreibung des Cytotoxizitätstests bezieht sich auf den Nachweis von Tubulysinen in den einzelnen Extrakten der Transposon-Mutantenbank von *A. disciformis* An d48. Die Kultivierung und Extraktion ist unter 2.4.2.2.1 bzw. 2.4.3.2 beschrieben.

Für diesen Test wurden L929 Zellen in DMEM-Medium (Invitrogen, Groningen) bei 37°C kultiviert und danach mittels Zellschaber vorsichtig geerntet. Diese

Zellsuspension wurde anschließend mit DMEM verdünnt (50.000 Zellen/ml) und 120 µl pro Öffnung einer 96-Mikrotiterplatte verteilt. Anschließend wurden 10 µl Zellextrakt der jeweiligen Transposon-Mutanten zugesetzt und für fünf Tage bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden die L929 Zellen lichtmikroskopisch (Axiovert 35 Auflichtmikroskop, Zeiss) auf eine charakteristische ZellkernfrAGMENTIERUNG bzw. Tubulysin-Wirkung hin untersucht. Bei Zellen, die keine ZellkernfrAGMENTIERUNG zeigten, wurden die entsprechenden Mutanten als mutmaßliche Tubulysin Knockout-Mutanten identifiziert. Die Extrakte dieser Mutanten wurden in 50 ml M7-Produktions-Medium (+ 1ml Absorber-Harz XAD-16) angezogen und die Zellkerne der L929-Zellen nach dem Cytotoxizitätstest zusätzlich durch eine Anfärbung des Chromosoms mittels DAPI-Färbung (Vollenweider & Groscurth, 1992) untersucht. Für diese Untersuchung wurde der Zellüberstand in den Mikrotiterplatten vorsichtig abgezogen und zu den adhärenT wachsenden Zellen 100 µl 50% Ethanol gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei RT wurde der Ethanol wiederum abgezogen. Die Zellen wurden mit 50 µl DAPI-Lösung (1 µg/ml PBS) beschickt und für 10 min bei RT inkubiert. Die Auswertung erfolgte durch Fluoreszenzmikroskopie. Durch die DAPI bedingte Anfärbung der Chromosomen konnte somit eine eindeutige Aussage über eine mögliche ZellkernfrAGMENTIERUNG getroffen werden.

Gleichzeitig wurden die Extrakte der eventuellen Tubulysin Knockout-Mutanten über einen HPLC-Lauf fraktioniert (s. 2.5.22.1) und anschließend mittels Cytotoxizitätstest auf eine Tubulysin-Wirkung untersucht. Bei der Fraktionierung des HPLC-Laufs wurde jede 30 sec eine Fraktion aufgefangen. Aufgrund einer Flussrate von 0,5 ml/min entsprach das einem Fraktionsvolumen von 250 µl. Durch die Fraktionierung wird eine Maskierung der Tubulysine durch Myxothiazol vermieden. Da die beiden Sekundärmetabolite verschiedene Retentionszeiten bei der Elution von einer C-14 Säule besitzen, liegen diese im folgenden Cytotoxizitätstest in unterschiedlichen Fraktionen vor.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters. Dies sollte durch molekularbiologische Methoden sowie biologische und chemische Analytik erreicht werden. Als Tubulysin-Produzenten standen die Bakterien-Stämme *Angiococcus disciformis* An d48, *Archangium gephyra* Ar 315, *Cystobacter ferrogeneus* Cb fe22, *Cystobacter minor* Cb m20, *Cystobacter violaceus* Cb vi63 und *Stigmatella erecta* Pd e68 aus der Stammsammlung von Prof. Reichenbach zur Verfügung. Im folgenden wird beschrieben, weshalb und wie die Aufklärung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in *A. disciformis* An d48 durchgeführt wurde. Ebenso werden Untersuchungsergebnisse zur Regulation der Sekundärmetabolit-Biosynthese in dem Myxobakterium *A. disciformis* An d48 aufgezeigt, über die zu Beginn dieser Arbeit nichts bekannt war.

3.1 Versuch der Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in *S. erecta* Pd e68

Die Identifizierung des Tubulysin-Genclusters in *S. erecta* Pd e68 sollte mittels zwei verschiedener Strategien erfolgen. Basierend auf der Struktur der Tubulysine wurde ein hypothetischer Aufbau des Genclusters postuliert. Es wurde vermutet, dass es sich um ein gemischtes NRPS-/PKS-Gencluster handelt, dass zusätzlich modifizierende Gene enthält. Zu Beginn dieser Arbeit war aus Myxobakterien nur ein Hybrid-Gencluster bekannt, das für die Biosynthese des Naturstoffs Myxothiazol verantwortlich ist (Silakowski *et al.*, 1999). *S. erecta* Pd e68 produziert neben Tubulysin die Naturstoffe Myxalamid, Aurachin und Myxothiazol. Aus dem Myxobakterium *S. erecta* Pd e68 sollte zunächst eine Cosmid-Genbank hergestellt und durch Hybridisierungsversuche sollten solche Cosmide isoliert werden, die sowohl PKS- als auch NRPS-Gensequenzen tragen. Durch den ungewöhnlichen Aufbau eines Hybrid-Genclusters sollten dadurch nur Cosmide isoliert werden, die entweder Teile des Myxothiazol- oder des Tubulysin-

Genclusters beinhalten. Eine zweite Strategie war, durch homologe Rekombination eine nicht produzierende Tubulysin Mutante zu generieren, um somit das Gencluster identifizieren zu können.

Für beide Identifizierungs-Strategien des Tubulysin-Biosynthesegenclusters wurden homologe PKS- bzw. NRPS-Fragmente aus *S. erecta* Pd e68 benötigt. Diese wurden mit degenerierter NRPS- und PKS-Primerpaaren (s. Tab. 2.3.4) über PCR amplifiziert. Die erhaltenen Amplifikate sollten eine Größe von ca. 500 bp (PS-Primer) und etwa 750 bp (PKS-Primer) aufweisen. Nach der PCR-Reaktion wurden die Fragmente in pCR2.1[®]-TOPO Vektor kloniert und sequenziert. Insgesamt konnten auf diese Weise fünf verschiedene PKS- und vier NRPS-Fragmente aus *S. erecta* Pd e68 amplifiziert und identifiziert werden. Die Plasmide, welche die PKS-Fragmente enthalten wurden mit pKSGAS und dementsprechend die Plasmide, die PS-Fragmente tragen mit pPSGAS bezeichnet (s.Tab. 3.1.1).

Tab. 3.1.1: Sequenzhomologien der klonierten PKS- und NRPS-Fragmente.

Plasmid	Homologien zu	Genbankeintrag	I [in %]	Ä [in %]
pKSGAS1.1	MxaC (<i>S. aurantiaca</i>)	AKK57187	95	95
pKSGAS1.2	MxaC (<i>S. aurantiaca</i>)	AKK57187	95	98
pKSGAS1.4	MtaB (<i>S. aurantiaca</i>)	AAF19801	83	89
pKSGAS2.1	MxaB (<i>S. aurantiaca</i>)	AAK57186	62	75
pKSGAS2.5	MxaB (<i>S. aurantiaca</i>)	AAK57186	90	90
pPSGAS4.1	NRPS (<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>)	CAE53350	54	66
pPSGAS5.2	NRPS (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>)	CAA72311	51	61
pPSGAS5.4	NRPS (<i>Nostoc punctiforme</i>)	ZP_00110263	54	70
pPSGAS7.5	NRPS (<i>Streptomyces lavendulae</i>)	AAK81826	47	58

3.1.1 Erstellen einer Cosmid-Genbank aus *S. erecta* Pd e68 und Hybridisierung mit homologen Sonden

Zur Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *S. erecta* Pd e68 wurde chromosomale DNA isoliert (s. 2.5.1) und eine Cosmidbank aus 1920 Klonen generiert. Nach dem Transfer der Cosmidbank wurden Hybridisierungen mit gemischten PKS- bzw. NRPS-Sonden durchgeführt. Die gemischten Sonden enthielten zum einen homologe NRPS-Fragmente (pPSGAS5.2-7.5) bzw. KS-Fragmente (pKSGAS1.1-2.5) und des weiteren heterologe Fragmente aus dem Myxalamid- (pCBS18/38) bzw. Myxothiazol-Gencluster (pBS36/3 KS PCR-Amplifikate). Diese heterologen Fragmente wurden aus den Myxobakterien *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 und DW 4/3-1 isoliert

(zur Verfügung gestellt von B. Silakowski). Die Membranen wurden unter schwach stringenten Bedingungen bei einer Temperatur von 38°C hybridisiert und bei 58°C gewaschen. Auf diese Weise sollten alle Cosmide identifiziert werden, die sowohl reine Polyketidsynthase- bzw. Peptidsynthetase-, als auch gemischte Gensequenzen trugen.

Es konnten insgesamt 74 Cosmide identifiziert werden, die ein Signal mit jeweils einer der eingesetzten Sonden ergaben. Die Cosmide wurden daraufhin in PCR-Analysen mit den degenerierten NRPS- und PKS-Primerpaaren auf gemischte Genclustersequenzen hin untersucht. Die Hybridisierungs-Temperatur dieser PCR-Analysen betrug 52°C. 13 der 74 Cosmide ergaben Amplifikate der erwarteten Größe und wurden nach einer Klonierung in pCR2.1[®]-TOPO sequenziert. Gleichzeitig wurden sie als Sonde markiert (s. 2.5.14.2) und in weiteren Hybridisierungsversuchen eingesetzt, um eine mögliche Gruppierung der Fragmente vornehmen zu können.

Es konnten 2 verschiedene Gruppen mit jeweils fünf Cosmiden identifiziert werden. Durch Hybridisierungen mit den heterologen Myxalamid- und Myxothiazol-Sonden (siehe oben) bei 42°C und folgenden Endsequenzierungen der Cosmide wurden die beiden Gruppen als Cosmid-Klone dieser beiden Gencluster aus *S. erecta* Pd e68 identifiziert. Ebenso konnte durch die Hybridisierungen (42/68°C) mit den homologen pKSGAS-Sonden gezeigt werden, dass drei Fragmente aus dem Myxalamid- (KS1.1, 1.2 und 2.5) und eins aus dem Myxothiazol-Gencluster (KS2.1) stammen. Die Herkunft eines der pKSGAS- (KS1.4) und der vier pPSGAS-Fragmente konnte nicht geklärt werden. Weitere Hybridisierungsversuche zur Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in einem der verbleibenden Cosmide ergaben keine eindeutigen Ergebnisse.

Da im Laufe dieser Untersuchungen klar wurde, dass viele Sekundärmetabolite aus Myxobakterien (Gerth *et al.*, 2003; Silakowski *et al.*, 2001a) durch Multienzym-Komplexe gebildet werden, die durch Hybrid-Gencluster codiert sind, wurden die Hybridisierungsversuche zur Auffindung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters eingestellt. Ein eindeutiger Beweis, dass eines dieser Cosmide das Tubulysin-Biosynthesegencluster trägt, musste durch eine Tubulysin-Knockout-Mutante erbracht werden. Die Mutagenese von *S. erecta* Pd e68 sollte durch Rekombination eines homologen Fragmentes in das Genom nach Elektrotransformation der Zellen erreicht werden (s. 2.5.15).

3.1.2 Transformationsversuche von *Stigmatella erecta* Pd e68 mittels Elektroporation

Zur Überprüfung der genetischen Manipulierbarkeit von *S. erecta* Pd e68 sollte eine Geninaktivierung mit homologen Fragmenten durch Elektrotransformation nachgewiesen werden. Bevor die Versuche zur Generierung einer Knockout-Mutante der Tubulysin-Biosynthese in *S. erecta* Pd e68 durchgeführt wurden, wurde das Wachstumsverhalten dieses Stammes auf verschiedenen Festmedien und in verschiedenen Flüssigmedien überprüft. *S. erecta* Pd e68 wurde dafür über einen Zeitraum von 4 Wochen mehrere Male sowohl von Platte in Flüssigkultur, als auch umgekehrt passagiert. Als Medien dienten Trypton-, TS-, VY/2- und M7-Medium. Die Bakterien wurden in zwei parallelen Ansätzen des jeweiligen Mediums angezogen, wobei jeweils ein Ansatz mit 0,1% (v/v) Vitamin B₁₂ Stocklösung versetzt wurde.

S. erecta Pd e68 wuchs über mehrere Passagen in allen getesteten Medien ohne erkennbare Unterschiede. Von den ausplattierten Bakterien wuchsen auf Festmedien über 80% als Einzelkolonien wieder an. Nachdem die Zellen angewachsen waren, begannen sie mit einer hohen Geschwindigkeit zu schwärmen (ca. 1cm/Tag). Im Gegensatz zu anderen Myxobakterien konnte *S. erecta* Pd e68 auch mit geringen Zellzahlen ($< 10^6$ Zellen / ml) in Flüssigmedien angeimpft werden. Dabei zeigten die Zellen ein „adaptiertes Verhalten“ an das Schütteln im Kolben, indem sie in hoch organisierten, abgerundeten Aggregaten wuchsen. Aus diesen Aggregaten werden nur für ein kurzes Zeitfenster Einzelzellen entlassen. Wann und warum die Zellen aus den Aggregaten entlassen werden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht spezifiziert werden. Der Gentransfer nach *S. erecta* Pd e68 wurde mittels Elektroporation nach einem modifizierten Protokoll von Beyer *et al.* (s. 2.5.15.1) durchgeführt. Für die Etablierung eines Mutageneseprotokolls von *S. erecta* Pd e68 wurde die Spannung je durchgeführter Elektroporation von 0,4-0,9 kV erhöht. Die Erhöhung fand in 0,1 kV Schritten statt. Die eingesetzten Plasmide waren pPSGAS5.4 und pKSGAS2.1 (1 µg DNA/Transformationsansatz). Zusätzlich wurde für jede Elektroporation die Sterberate und die Spontanmutationsrate bestimmt. Dazu wurden parallel zu jedem Transformationsansatz Zellen mit H₂O elektroporiert und nach der phänotypischen Expression $1 \cdot 10^4$ - $1 \cdot 10^8$ Zellen auf Trypton-Platten mit bzw. ohne Kanamycin (50 µg/ml)

ausgebracht. Das Ziel dieser Versuchsreihe war, das bestmögliche Verhältnis von Mutanten/Spontanmutanten bei geringster Sterberate zu erzielen.

Nach 8 Tagen Inkubation bei 32°C wurde die Anzahl der gewachsenen Klone je Transformationsansatz gezählt und ausgewertet. Die Sterberate betrug bei einer angelegten Spannung von 0,4 kV 99% und nahm bis 0,9 kV auf 99,99% zu. Insgesamt wurde ein Verhältnis von 43 „Transformanten“ zu 21 Spontanmutanten (2:1) auf den kanamycinhaltigen Platten detektiert. Von den mutmaßlichen Mutanten wurde nach Kultivierung in 50 ml Trypton-Medium die genomische DNA isoliert und auf die Insertion des Kanamycin-Resistenzgens aus dem pCR2.1®-TOPO Vektor hin untersucht. Mit dem Primerpaar SB35/SB36 wurde ein Fragment des Kanamycin-Resistenzgens aus dem Vektor amplifiziert und als markierte Sonde in einer Hybridisierung eingesetzt. Die genomische DNA der einzelnen Mutanten wurde zuvor mit *Bam*HI hydrolisiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Hybridisierung wurde unter stringenten Bedingungen durchgeführt.

Die Detektion erbrachte bei keiner der 43 untersuchten Klone ein Signal. Die Kanamycin-Resistenz war bei sämtlichen „Transformanten“ spontan entstanden und somit keine gerichtete Mutagenese unter diesen Bedingungen nachweisbar. Bedingt durch das inhomogene Wachstum von *S. erecta* Pd e68 in Flüssigmedien konnte nicht definiert werden, in welcher Wachstumsphase sich die Zellen beim „Entlassen“ aus den Aggregaten befinden und somit keine genaue Zellzahl pro Elektroporationsansatz definiert werden. Der physiologische Zustand der Bakterien konnte daher als Parameter für die Etablierung einer gerichteten Mutagenese durch Elektroporation nicht verändert werden.

3.2 Untersuchung alternativer Tubulysin-Produzenten

Aufgrund der hohen Spontanmutationsrate von *Stigmatella erecta* Pd e68 und dem fehlenden Nachweis, dass sich dieser Stamm genetisch manipulieren ließ, wurde eine neue Strategie zur Identifizierung des Tubulysin-Genclusters verfolgt. Dafür wurden fünf weitere Tubulysin-Produzenten in die Arbeit einbezogen (s. Tab. 2.2.1). Diese Stämme wurden auf ihre genetische Manipulierbarkeit hin getestet und gleichzeitig die

Plattierungseffizienzen bzw. Überlebensraten nach einer durchgeführten Elektroporation bestimmt. Zunächst wurde für diese Stämme gezeigt, dass sie in Trypton-Medium mit einer Generationszeit von ca. 6 Stunden wachsen und dabei keine Aggregate bilden. Um gleiche Bedingungen für die Transformationen der verschiedenen Bakterien-Stämme zu erhalten, wurden 50 ml Trypton-Medium mit 2×10^7 Zellen/ml angeimpft und ÜN bei 30°C inkubiert. Die Elektroporation der jeweiligen Bakterien wurde nach dem Standardprotokoll für *S. aurantiaca* durchgeführt (s. 2.5.15.1). Bei allen Ansätzen wurden die Bakterienzellen parallel mit $H_2O_{\text{dest.}}$ transformiert und nach einer phänotypischen Expression von 6 h auf verschiedenen Festmedien (VY/2- und Trypton-Medium) in einer ansteigenden Reihe von 1×10^3 bis 1×10^8 Zellen ausplattiert, um die Überlebensrate zu bestimmen. Nach einer Inkubation der Platten für 8 Tage bei 32°C wurden die Klone ausgezählt. Zur Bestimmung eines Mittelwerts wurde dieses Experiment mit drei parallelen Ansätzen durchgeführt.

In der Tab. 3.2.1 ist zu sehen, dass die Stämme, obwohl sie nahe verwandt sind, ein sehr unterschiedliches Wachstumsverhalten auf den verschiedenen Festmedien besitzen. Ein Unterschied im Wachstumsverhalten ohne den Stress-Faktor Elektroporation ließ sich nicht feststellen. Für den Stamm *A. disciformis* An d48 wurde die höchste Überlebensrate mit 80% auf Trypton-Festmedium bestimmt. Die Überlebensrate auf VY/2-Agar war mit 50% genau so hoch wie bei den Stämmen *C. ferrogeneus* Cb fe22 (Trypton-Agar) und *C. minor* Cb m20 (VY/2-Agar).

Tab. 3.2.1: Plattierungskontrolle alternativer Tubulysin-Produzenten. Die Effizienzen wurden nach einer durchgeführten Transformation mit H_2O mittels Elektroporation unter Standardbedingungen bestimmt. Die Überlebensrate wurde durch auszählen der angewachsenen Klone, bezogen auf die ausplattierte Zellzahl, bestimmt. Die Werte sind Mittelwert dreier Parallellansätze.

Stamm	VY/2-Agar (Überlebensrate in %)	Trypton-Agar (Überlebensrate in %)
<i>A. disciformis</i> An d48	50	80
<i>A. gephyra</i> Ar315	10	40
<i>C. ferrogeneus</i> Cb fe22	4	50
<i>C. minor</i> Cb m20	50	5
<i>C. violaceus</i> Cb vi63	2	10
<i>S. erecta</i> Pd e68	n.e.	1*

* Elektroporation mit 0,4 kV

3.2.1 Bestimmung der Transformationseffizienz verschiedener Myxobakterien mittels Transposonmutagenese

Aufgrund der festgestellten Überlebensraten der einzelnen Tubulysin-Produzenten nach der Elektroporation, wurden die Stämme *A. disciformis* An d48 und *C. ferrogeneus* Cb fe22 auf ihre genetische Manipulierbarkeit hin untersucht. Für diese Versuche wurden zwei verschiedene Transposon-Systeme ausgewählt, die durch Elektroporation in die Zellen transferiert werden sollten. Die Integration der Fremd-DNA (transposables DNA-Fragment) in das bakterielle Genom findet nach der Expression einer Transposase statt, deren kodierendes Gen mit in die Zelle transferiert wurde. Da eine Transposition enzymatisch katalysiert wird, findet dieses Ereignis im Vergleich zu einer homologen Rekombination um ein Vielfaches häufiger statt (s. 3.3.5). Der Nachteil dieser Mutagenese ist, dass sie ungerichtet ist und dadurch eine Insertion in die gewünschte Zielsequenz nur zufällig stattfindet. Zur Überprüfung der Transformation der Stämme An d48 und Cb fe22 wurde das EZ::TNTM<KAN-2>Tnp TransposomeTM Kit (Fa. Epicentre) und das Plasmid pMycoMar (Rubin *et al.*, 1999) getestet.

3.2.1.1 Transformation von *A. disciformis* An d48 und *C. ferrogeneus* Cb fe22 mit dem „EZ::TNTM<KAN-2>Tnp TransposomeTM Kit“

Beide Stämme wurden mit den gleichen Bedingungen von Beyer *et al.* elektroporiert. Es wurden jeweils drei parallele Elektroporationen durchgeführt und von den Ansätzen je 1/100, 1/10 und der Rest auf Kanamycin-haltigen Trypton-Platten ausgebracht. Zur Bestimmung einer Spontanmutationsrate wurde jeweils ein Elektroporationsansatz mit H₂O_{dest.} durchgeführt.

Bei den Ansätzen mit *A. disciformis* An d48 wuchsen nach 8 Tagen Inkubation bei 30°C 9 bzw. 6 Klone. Es gab keine spontan resistente Mutante, die auf kanamycin-haltigen Platten wuchs. Die Transformationen von *C. ferrogeneus* Cb fe22 ergaben keine Klone.

Aus den erhaltenen Klonen von *A. disciformis* An d48 wurde die chromosomale DNA isoliert und mittels PCR auf die Insertion des Transposons hin untersucht. Dafür wurde das PCR-Primerpaar SB35Scre/SB36Scre (s. Tab. 2.3.4) bei einer Annealing-Temperatur von 58°C verwendet. Bei allen 9 Transformanten ergab die PCR ein spezifisches Amplifikat des Kanamycin-Resistenzgens aus Tn903, was als Beweis für

die Integration des Transposons diene und damit die genetische Manipulierbarkeit dieses Stammes nachwies. Aufgrund der geringen Transformationseffizienz war dieses „Kit“ dennoch ungeeignet für die Herstellung einer Transposon-Mutantenbank.

3.2.1.2 Transformation von *A. disciformis* An d48 und *C. ferrogeneus* Cb fe22 mit dem Plasmid pMycoMar

Der Vektor pMycoMar enthält ein von *Himar1* abgeleitetes Mini-Transposon *magellan4*, das aus der Superfamilie der *mariner*/Tc1-Transposons stammt und zuerst aus der Hornfliege *Haematobia irritans* isoliert wurde (Robertson & Lampe, 1995). „Springende Gene“ dieser Superfamilie kommen in diversen eukaryontischen Organismen vor und besitzen einen ähnlichen „cut and paste“-Mechanismus bei der Transposition. Sequenzanalysen verschiedener *mariner*/Tc1-Elemente aus Insekten zeigten, dass ein horizontaler Gentransfer stattgefunden haben muss (Robertson & Lampe, 1995) und somit ein einzelnes Transposon zur Infektion verschiedener eukaryontischer Wirte befähigt ist. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass Elemente dieser Familie auch für die *in vitro* Transposition eingesetzt werden können, bei der Transposasen dieser Superfamilie in Abwesenheit jeglicher Wirts-Cofaktoren wirken können (Lampe *et al.*, 1996).

Rubin *et al.* (1999) entwickelten aus dem *mariner* Element *Himar1* das Plasmid pMycoMar, welches ein einfaches Transposonssystem darstellt, das effizient in Bakterien transferiert und *in vivo* zur Herstellung von Insertions-Mutanten benutzt werden kann. Dieses Plasmid enthält das Mini-Transposon *magellan4*, bei dem das Tn5 Kanamycin-Resistenzgen und der oriR6K von den *Himar1* „inverted repeats“ flankiert wird. Zusätzlich ist die *Himar1* Transposase unter der transkriptionellen Kontrolle des T6 Promotors in das mycobakterielle und Temperatur-sensitive Replicon pPR23 kloniert worden. pMycoMar kodiert ebenfalls ein Gentamycin-Resistenzgen.

Himar1 zeichnet sich bei der Transposition durch eine sehr hohe Integrationsspezifität aus. Durch die kurze TA Dinucleotid-Erkennungssequenz kann es nahezu zufällig in ein Wirts-Genom integrieren und statistisch gesehen alle aktiven Gene durch eine Insertionsmutation ausschalten.

Zur Überprüfung, ob dieses Transposon für die Mutagenese von Myxobakterien genutzt werden konnte, wurden die Stämme *A. disciformis* An d48, *C. ferogeneus* Cb fe22 und *S. aurantiaca* Sg a15 mit je 2 µg DNA transformiert. Des weiteren wurde der Stamm *M. xanthus* DK1622 verwendet, für den eine erfolgreiche Transformation bereits früher gezeigt werden konnte (H. Kaplan; pers. Mitteilung). Es wurden zwei parallele Elektrotansformationen für die Stämme *A. disciformis* An d48 und *C. ferogeneus* Cb fe22 nach den unter 2.5.15.1 und 2.5.15.2 aufgeführten Protokollen durchgeführt, um die Transformationseffizienzen miteinander vergleichen zu können. Die Stämme *S. aurantiaca* Sg a15 und *M. xanthus* DK1622 wurden jeweils nur nach dem für sie bestehenden Standard-Protokoll transformiert. Für die Bestimmung der Spontanmutationsrate wurde jeweils ein Ansatz ohne DNA transformiert und auf Kanamycinhaltigen Selektionsplatten ausgebracht. In der Tab. 3.2.2 sind die ermittelten Transformationseffizienzen zu sehen.

Bei der Transformation von *M. xanthus* DK1622 mit dem Vektor pMycoMar wurden $> 10^5$ Klone/2 µg DNA generiert. Diese Effizienz stimmt mit den Daten von H. Kaplan überein. Für den Stamm *A. disciformis* An d48 konnten in den unterschiedlichen Transformationsversuchen insgesamt 364 Klone erhalten werden. Gemäß dem Standard-Protokoll für *S. aurantiaca* wurden 116 und 134 Klone, entsprechend dem Protokoll für *M. xanthus* 67 und 47 Klone erhalten. Die Transformationseffizienz für den Stamm *C. ferogeneus* Cb fe22 war mit insgesamt 52 Klonen etwa um den Faktor 10 geringer. Die Bildung von spontanresistenten Klonen wurde nicht beobachtet.

Tab. 3.2.2: Transformationseffizienzen verschiedener Myxobakterien mit dem *Himar1* abgeleiteten Mini-Transposon *magellan4*. Angegeben sind die verschiedenen Transformationsprotokolle, die für die Elektroporationen eingesetzt wurden. Die Werte geben die Anzahl der Klone/2 µg eingesetzte DNA aus zwei separaten Transformationen an.

Stamm	Elektrotansformation nach Beyer <i>et al.</i>	Elektrotansformation nach Kashefi & Hartzell
<i>M. xanthus</i> DK1622	n.e.	$> 10^5$
<i>S. aurantiaca</i> Sg a15	430	n.e.
<i>A. disciformis</i> An d48	250	114
<i>C. ferogeneus</i> Cb fe22	38	14

n.e.: nicht ermittelt

3.3 Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *A. disciformis* An d48

3.3.1 Erzeugung einer Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 unter Verwendung des *Himar1* abgeleiteten Mini-Transposons *magellan4*

Aufgrund der ermittelten Transformationseffizienzen (s. 3.2.1.2) wurde eine *magellan4* verwendete Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 erstellt, die insgesamt 1200 Mutanten umfasst. Um diese Anzahl von Klonen kultivieren zu können, wurde zunächst überprüft, ob Einzelkolonien von *A. disciformis* An d48 in Mikrotiterplatten angezogen bzw. nach einer Dauerkonservierung aus diesen Platten wieder reaktiviert werden können. Für diesen Versuch wurden 30 Einzelkolonien von *A. disciformis* An d48 untersucht. Nach einer Kultivierung in Mikrotiterplatten (s. 2.4.2.2.1) und anschließender Lagerung bei -80°C, wurden 100 µl aller Dauerkulturen wieder auf Agarplatten aufgetropft und bei 30°C inkubiert. Insgesamt wuchsen 29 Klone (96,7%) wieder an. Daher wurden die 364 Transformanten, die zur Bestimmung der Transformationseffizienz generiert wurden, in Mikrotiterplatten kultiviert und bildeten so die ersten Klone der Transposon-Mutantenbank. Die restlichen Mutanten der Bank wurden bei einer ermittelten Transformationseffizienz von ca. 125 Klonen/2 µg DNA in 6 parallelen Elektroporationsansätzen erhalten. Insgesamt wurden bei diesen Transformationsansätzen weitere 836 Klone erzeugt und in Mikrotiterplatten kultiviert. Die gesamte Bank umfasste somit insgesamt 1200 Transposon-Mutanten, die in 13 Mikrotiterplatten kultiviert wurden. Bei einer hypothetischen Größe des Tubulysin-Biosynthesegenclusters von 40 kb (s. 1.6) und einer angenommenen Genomgröße von ca. 10 Mbp (Pradella *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1990) sollte daher in dieser Bank eine Tubulysin-Knockout-Mutante mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% (s. Diskussion 4.2.1, S. 136), enthalten sein.

Die Transposon-Mutantenbank wurde nach 8-10 Tagen Inkubation bei 32°C dreifach kopiert (s. 2.4.2.2.1). Zwei dieser Kopien wurden bei -80°C dauerkonserviert. Die beiden verbleibenden Kopien der Bank wurden für verschiedene Untersuchungen verwendet. Mittels Cytotoxizitätstest wurden die Extrakte einer Kopie auf erzeugte Tubulysin Knockout-Mutanten hin untersucht. Von der verbleibende Kopie wurden die

Extrakte der Klone durch HPLC-Analyse auf Mutationen in anderen Sekundärstoffen, die von diesem Stamm gebildet werden, untersucht. In Abb. 10 ist die zeitliche Abfolge der Herstellung der Mutantenbank über die Analysen bis zur Identifizierung einzelner Klone dargestellt. Nach der Identifizierung von Mutanten, die in den verschiedenen Analytiken Auffälligkeiten im Vergleich zum Wildtyp zeigten, wurden diese aus der Dauerkultur rekultiviert und die Untersuchungen mit Extrakten aus 50 ml Kulturen wiederholt.

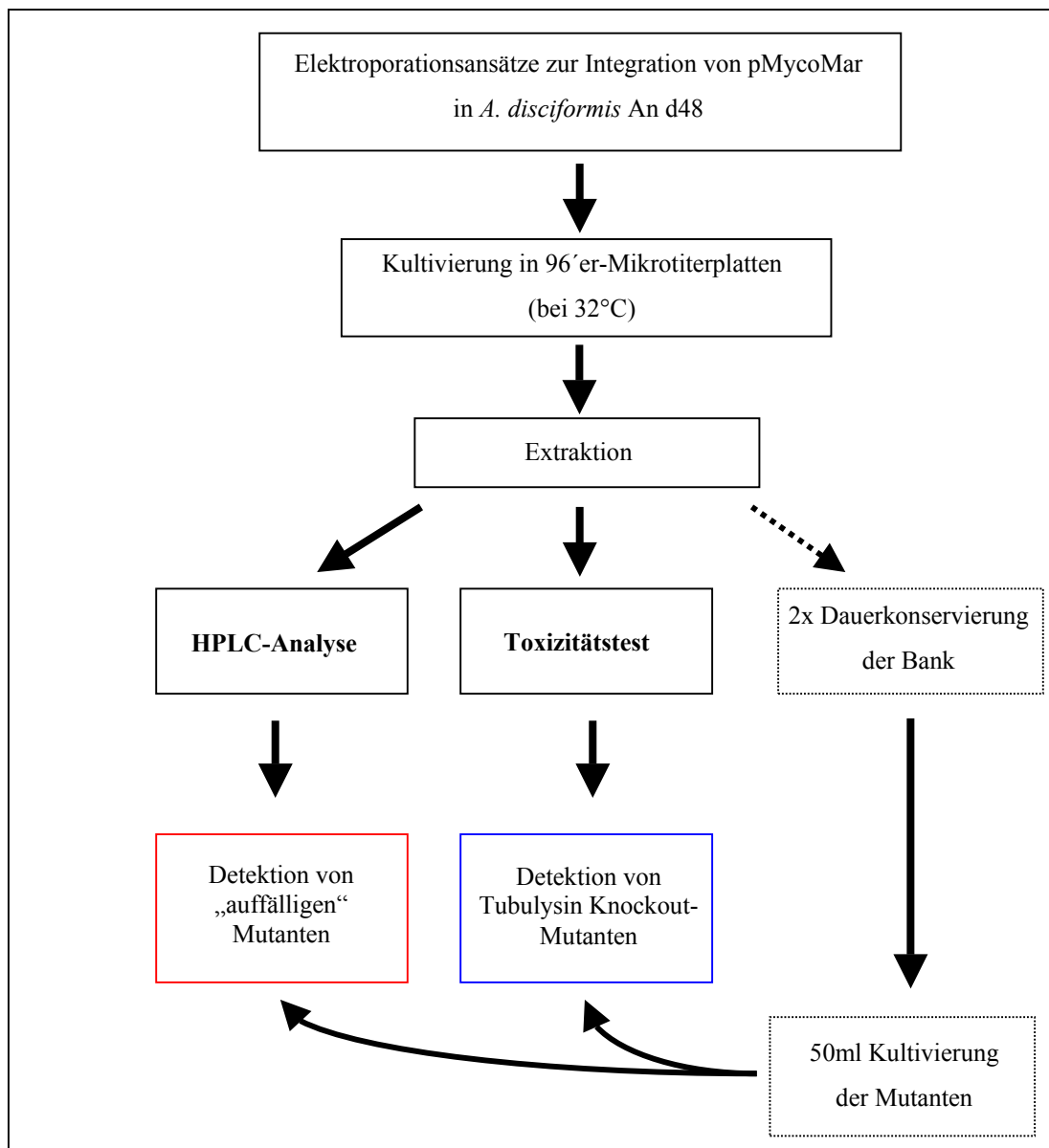


Abb. 10: Schema zur Generierung, Kultivierung und Analyse der Transposon-Mutantenbank. Auf diese Weise wurden neben der Identifizierung einer Tubulysin Knockout-Mutante, weitere Regulations- und Strukturgene von gebildeten Sekundärmetaboliten in *A. disciformis* An d48 untersucht werden. Die detektierten Mutanten wurden aus der Dauerkultur erneut angezogen und die jeweiligen Analysen mit Extrakten aus 50 ml Kulturen wiederholt.

3.3.2 Identifizierung von Tubulysin negativen Mutanten mittels Cytotoxizitätstest

Aufgrund der geringen Mengen an Tubulysinen, die von Myxobakterien produziert werden und dessen geringen Extinktionskoeffizienten sind diese Substanzen mittels DAD-gekoppelter HPLC-Analyse nicht detektierbar. Für den Nachweis eines nicht Tubulysin produzierenden Klons aus der Transposon-Mutantenbank von *A. disciformis* An d48 wurde ein biologischer Cytotoxizitätstest (s. 2.5.22.2) durchgeführt. Dieser Test wurde von Dr. Florenz Sasse an der GBF in Braunschweig etabliert (Sasse *et al.*, 2000) und ermöglicht einen Nachweis von Tubulysinen in pikomolaren Konzentrationen. Für die Detektion der Tubulysine wird dabei ihre cytotoxische Wirkung auf eukaryontische Zellen ausgenutzt. Durch die Depolymerisation des Mikrotubuli-Netzwerkes kommt es in diesen Zellen zu einer Induktion der Apoptose (Khalil, 1999) und folgend zu einer charakteristischen Zellkernfragmentierung. Diese morphologische Veränderung der Zellen kann mittels Lichtmikroskopie nachgewiesen werden.

Innerhalb der gesamten Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 konnten vier Klone detektiert werden, deren Zellextrakt keine spezifische Tubulysin-Wirkung auf eukaryontische Zellen zeigte. Nach einer Behandlung der L929 Zellen mit DAPI-Lösung zeigte sich eine eindeutig intakte Morphologie der Zellkerne (s. Abb. 11). Die Mutanten MutT176, 781, 794 und 929 wurden aus der Dauerkultur reaktiviert und in einer 50 ml Kultur angezogen. Um das Ergebnis erneut zu überprüfen, wurde von diesen Kulturen Extrakte gewonnen und wiederum in einem Cytotoxizitätstest gegenüber dem Wildtypen *A. disciformis* An d48 untersucht. Für diese Untersuchungen wurden 20 µl der jeweiligen Extrakte zunächst mittels HPLC fraktioniert (s. 2.5.22.1) und sämtliche Fraktionen im biologischen Assay eingesetzt. In keinem der vier untersuchten Mutanten konnte in dieser Versuchsreihe eine charakteristische Tubulysin-Wirkung nachgewiesen werden. Damit wurde Ergebnis des ersten Tests bestätigt.

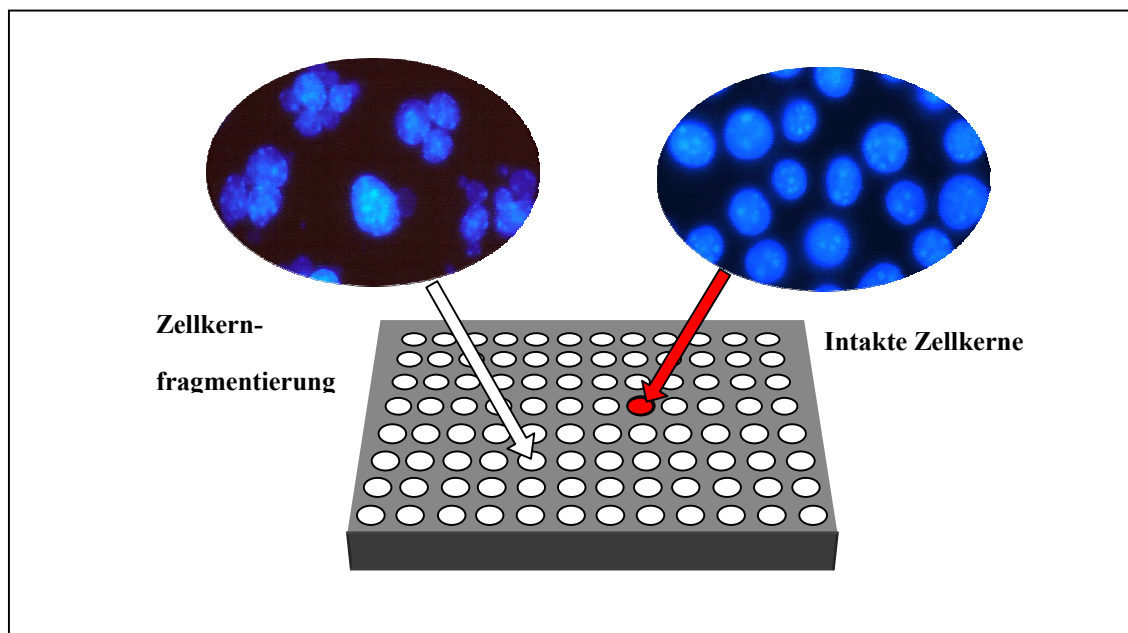


Abb. 11: Cytotoxizitätstest der Transposon-Mutanten von *A. disciformis* An d48. Nicht produzierende Tubulysin Mutanten konnten durch das Fehlen der charakteristischen Tubulysin-Wirkung auf eukaryontische L929 Zellen (Zellkernfragmentierung) nachgewiesen werden. Die Bilder zeigen eine mit DAPI-Lösung gefärbte Zellkultur. Diese fluoreszierende Verbindung interkaliert in die DNA und lässt den morphologischen Zustand des Zellkerns erkennen. Aus den 1200 Transposon-Mutanten von *A. disciformis* An d48 konnten durch diesen biologischen Assay insgesamt 4 Tubulysin Knockout-Mutanten identifiziert werden.

3.3.3 „Transposon-recovery“ und Sequenzanalyse der verschiedenen Mutanten

Um Informationen zu erhalten, in welchen Bereich des Genoms das *magellan4* in den vier nicht produzierenden Mutanten (Tubulysin-Knockout-Mutanten) transponierte, wurde ein „Transposon-recovery“ durchgeführt (s. 2.5.17). Für diese „Ausklonierung“ wurden die Restriktionsendonukleasen *NotI*, *BamHI* und *XbaI* verwendet. Nach Religation der DNA-Fragmente und Transformation in *E. coli* DH5 α /λpir wurden die Transposon-Plasmide isoliert und die Inserts sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurden dann mit dem Programm NCBI-BLAST auf vorhanden Homologien zu bestehenden Genbank-Einträgen untersucht (Tab. 3.3.1).

Die erhaltenen Sequenzen der Transposon-Plasmide aus MutT176, MutT781, MutT794 und MutT929 zeigten signifikante Ähnlichkeiten zu Fragmenten aus nicht ribosomalen Peptidsynthetasegenen, wie dem Myxothiazol-, Nostopeptolid- und Saframycin-

Biosynthesegenclustern. Diese Analysen ergaben Hinweise dafür, dass es sich um Sequenzfragmente aus dem gesuchten Tubulysin-Biosynthesegencluster handelt.

Tab. 3.3.1: Sequenzhomologien der abgeleiteten Aminosäuresequenz der DNA-Inserts aus den erzeugten „Transposon-Plasmiden“ der verschiedenen Tubulysin Knockout-Mutanten.

Mutante MutT	„Transposon-recovery“	Sequenzhomologien zu
MutT176	<i>Bam</i> HI; <i>Xba</i> I	NRPS (<i>S. coelicolor</i>) MtaD (<i>S. aurantiaca</i>)
MutT781	<i>Bam</i> HI	NRPS (<i>S. coelicolor</i>) NosA (<i>N. spec</i>)
MutT794	<i>Not</i> I; <i>Bam</i> HI	NosD (<i>N. spec</i>) NosA (<i>N. spec</i>)
MutT929	<i>Bam</i> HI	NRPS (<i>S. coelicolor</i>) NRPS (<i>P. aerogenosa</i>)

Durch Restriktions- und Southernanalysen sollten die Größe sowie die relativen Integrationsorte des *magellan4* in den verschiedenen „Transposon-Plasmiden“ pMutT176-929 bestimmt werden. Für die Hybridisierungen wurde das Tn5-Kanamycin-Resistenzgen als Sonde eingesetzt, welches mit dem Restriktionsenzym *Mlu*I aus pMycoMar isoliert und markiert wurde.

Beim „Transposon-recovery“ (Ausklonieren) mit dem Restriktionsenzym *Not*I aus dem Genom von MutT794 wurde ein Plasmid gewonnen, das ein Insert von ca. 50 kb chromosomaler DNA trägt. Alle anderen Transposon-Plasmide trugen ca. 6-12 kb große Inserts. Die Hybridisierungen der chromosomalen DNA aller Mutanten nach *Bam*HI- und *Not*I- Restriktion zeigten, dass das *magellan4* in den Mutanten MutT794, 781 und 929 in einen engen Genombereich von ca. 6 kb transponiert war. Die Integrationsstelle in der Mutante MutT176 ließ sich auf diese Weise nicht zu den anderen Mutanten einordnen. Die Integrationsstelle muss somit außerhalb des 50 kb *Not*I-Fragments liegen. Aufgrund der Ergebnisse des Cytotoxizitätstests und der erhaltenen Sequenzhomologien wurde das pMutT794/*Not*I Transposon-Plasmid sequenziert.

3.3.4 Identifizierung von Strukturgenen des Tubulysin-Biosynthesegenclusters

Durch die Sequenzierung des Plasmids pMutT794/*NotI* wurden insgesamt 52985 bp Sequenzinformation erhalten. Zusammen mit dem *HimarI* abgeleiteten Minitransposon *magellan4* (2199 bp), das bei Basenpaar 37317 integriert ist, wurden 55184 bp sequenziert. Pro- und Eukaryonten benutzen Codons, die in ihrer Basenzusammensetzung charakteristisch für den GC-Gehalt des gesamten Genoms sind. Der degenerierte genetische Code erlaubt dabei die höchste Variabilität in der dritten Position eines Aminosäure kodierenden Codons. Deshalb benutzen Organismen mit einem hohen GC-Gehalt präferentiell Codons mit einem G oder einem C in dieser Position (Bibb *et al.*, 1984). Innerhalb kodierender Abschnitte besitzen Myxobakterien in der ersten Codon-Position einen GC-Gehalt von ca. 70%, etwa 50% in der zweiten und ca. 90% in der dritten Codon-Position, bei einem durchschnittlichen GC-Gehalt von 69% (Shimkets, 1993).

Insgesamt 21,8 kb stammen aus kodierenden Genen des Tubulysin-Biosynthesegenclusters und 31,2 kb enthalten Gene, deren Genprodukte keine offensichtliche Funktion in der Tubulysin-Biosynthese haben. Bei diesen offenen Leserahmen (ORFs) handelt es sich zum Teil um Regulatoren, die möglicherweise die Expression der Tubulysin-Gene beeinflussen (s. Tab. 3.3.4, S. 100). Sequenzvergleiche mit den „Transposon-Plasmiden“ der anderen Tubulysin Knockout-Mutanten zeigten, dass das *magellan4* bei den Mutanten MutT781 (36975bp) und MutT929 (36197 bp) innerhalb von 1658 bp zu MutT794 in das Biosynthesegencluster transponiert ist. Wie bereits die Restriktions- und Southernanalytiken zeigten, liegt der Integrationsort bei der Mutante MutT176 außerhalb der bis zu diesem Zeitpunkt bekannten Sequenz des Tubulysin-Genclusters.

Durch die Analyse der DNA-Sequenz wurden innerhalb der 21760 bp sieben offene Leserahmen identifiziert. Die abgeleitete Aminosäuresequenz der Gene *tubA-C* zeigten dabei signifikante Ähnlichkeiten zu nicht ribosomalen Peptidsynthetasen. Das Gen *tubZ* kodiert für eine Cyclodeaminase und *tubD* kodiert Teile einer Polyketidsynthase. Innerhalb des Gens *tubD* endet die erhaltene Sequenz. Des weiteren liegt innerhalb dieser DNA-Sequenz ein Gen, das einen Anionentransporter kodiert (*orfI*), welcher eventuell zum Austransport des Tubulysins aus der Zelle dient. Die Funktion des Gens

orf2 ist nicht bekannt (s. Abb. 12). Der Sequenzabschnitt, der die Gene *tubA* bis *tubD* enthält, besitzt einen GC-Gehalt von 70 %, der typisch für Myxobakterien ist (Mc Curdy & Wolf, 1967; Mandel & Leadbetter, 1965). Der GC-Gehalt in der 1., 2. und 3. Position innerhalb der identifizierten ORFs ist charakteristisch für myxobakterielle Gene (siehe Tab. 3.3.3; S. 95) und zeigt, dass es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um kodierende Abschnitte handelt.

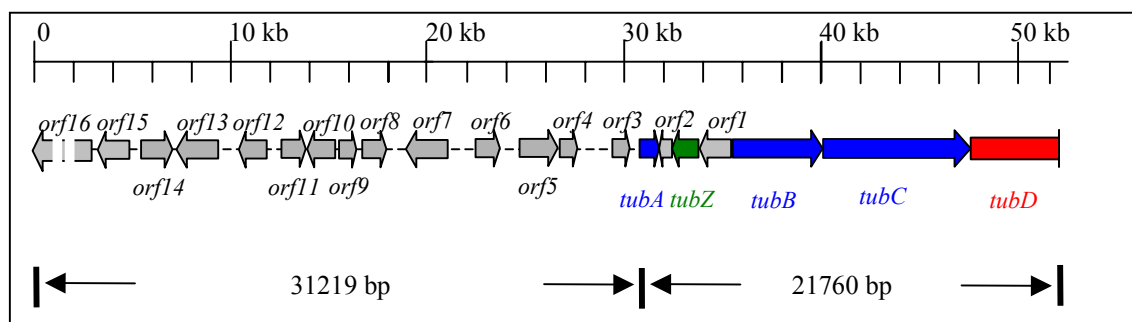


Abb. 12: Abfolge der offenen Leserahmen auf dem Plasmid pMutT794/NorI. In der Abbildung sind alle ORFs angegeben, die identifiziert werden konnten. Die letzten 21760 bp tragen Sequenzinformationen des Tubulysin-Biosynthesegenclusters von *tubZ* (codiert für eine Cyclodeaminase) bis *tubD* (codiert für eine PKS). Innerhalb von *tubD* liegt die *NorI*-Erkennungssequenz, welcher für die Ausklonierung genutzt wurde. Die Sequenzhomologien der einzelnen Gene sind in den Tab. 3.3.3 (S. 95) und 3.3.4 (S. 100) beschrieben. NRPS kodierende Gene sind blau, PKS kodierende Gene rot und das Lysin-Cyclodeaminase kodierende Gen (*tubZ*) grün dargestellt. ORFs, deren abgeleiteten Genprodukt eine unbekannte Funktion hat, sind grau dargestellt.

3.3.5 Insertionsinaktivierung der Tubulysin-Biosynthese durch homologe Rekombination

Ein zusätzlicher Nachweis, dass es sich bei der Sequenz um Teile des Tubulysin-Biosynthesegenclusters handelt, sollte durch eine gerichtete Mutagenese erhalten werden. Bei dieser Mutagenese wird zunächst ein spezifisches DNA-Fragment über einen Suizid-Vektor (Fremd-DNA) in die Bakterienzelle transferiert. Zur Konstruktion der entsprechenden Mutageneseplasmide wurde der Vektor pCR 2.1-TOPO verwendet, der sowohl ein Kanamycin- als auch Ampicillin-Resistenzgen enthält. Auf der Kanamycin-Resistenz beruht die Selektion zum Nachweis der Integration des Mutageneseplasmids in das Genom. Nach erfolgter Transformation des Mutageneseplasmids in *A. disciformis* An d48 kommt es über homologe Rekombination zur Inaktivierung des Zielgens. Die Integration der Fremd-DNA in das Genom führt zur

Verdopplung des inserierten DNA-Abschnitts. Das betroffene Gen liegt im Genom in zwei Kopien vor, wobei die erste Kopie eine 5'-Deletion aufweist, während bei der zweiten Kopie das 3'-Ende des Gens deletiert ist (s. Abb. 13). Bei kleinen Genen besteht das Risiko, dass trotz der jeweiligen Deletion ein funktionsfähiges Protein gebildet wird. Des weiteren kann die Integrationen der Fremd-DNA einen polaren Effekt auf transkriptional oder translational gekoppelte Gene haben.

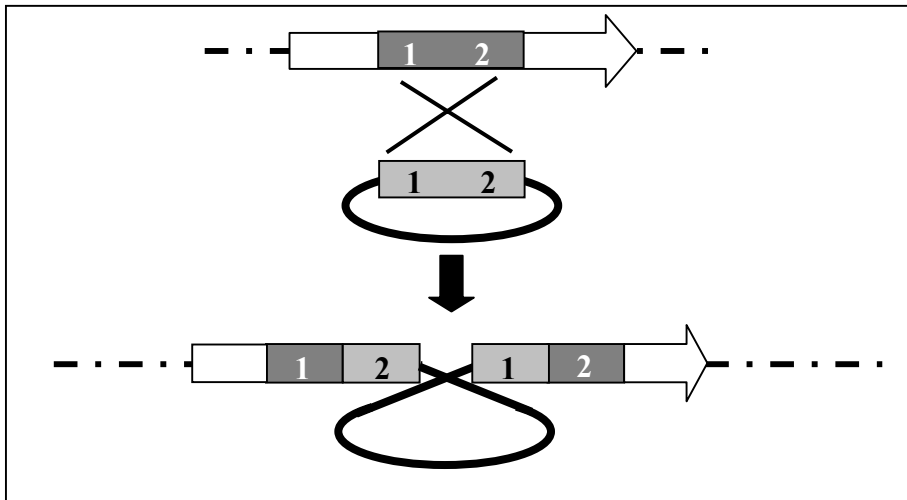


Abb. 13: Allgemeines Schema für eine Insertionsinaktivierung durch einfache homologe Rekombination. Nach der Transformation des Mutageneseplasmids in die Zelle kommt es zur homologen Rekombination. Die Fremd-DNA wird in das Gen integriert und führt dadurch zur Verdopplung des homologen DNA-Abschnitts und zu zwei unvollständigen Genkopien. Die homologen Genabschnitte aus dem Genom (dunkelgrau) und dem Plasmid-Insert (hellgrau) sind zur besseren Unterscheidung verschieden dargestellt.

Für die homologe Rekombination wurden die Plasmide pASTls1 und pASTls2 (s. Tab. 2.3.2) verwendet. Das Insert von pASTls1 ist homolog zu einem Sequenzabschnitt aus *tubD*. pASTls2 enthält einen homologen Sequenzabschnitt aus *tubC*, der 9059 bp stromaufwärts zum Insert von pASTls1 liegt (s. Abb. 12). Die beiden spezifischen Fragmente wurden nach einer PCR-Amplifikation unter Standardbedingungen mit den Primerpaaren ASTls1A/B und 2A/B in pCR[®] 2.1-TOPO Vektor kloniert. Die Mutagenesplasmide wurden mittels Elektroporation (s. 2.5.15) in *A. disciformis* An d48 Zellen transformiert.

Bei beiden Transformationsansätzen konnte jeweils nur eine Mutante isoliert werden. Die Extrakte dieser beiden Klone wurden in einem Cytotoxizitätstest auf die Bildung von Tubulysin hin überprüft. Sowohl in diesem Test, als auch nach einer Fraktionierung

der Extrakte durch HPLC-Chromatographie und erneutem Einsatz im Cytotoxizitätstest, konnte keine Tubulysin-Produktion in den Kulturen dieser Klone nachgewiesen werden. Ebenfalls wurde die chromosomale DNA der beiden Kanamycin-resistenten Klone isoliert und analysiert (s. 2.5.1 und 2.5.14). Die Southern Blot Analyse zeigte für beide Mutanten eine ortspezifische Integration der Mutagenese-Konstrukte. Die Hybridisierung wurde unter höchst stringenten Bedingungen durchgeführt (42/68°C) und eine markierte Tn5-Kan^R Sonde eingesetzt. Diese Ergebnisse ließen den Schluß zu, dass es sich bei dem identifizierten Sequenzabschnitt um Teile des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *A. disciformis* An d48 handelt.

3.3.6 Klonierung und Sequenzierung des gesamten Tubulysin-Biosynthesegenclusters

Zusätzlich zur Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 wurde wie unter 2.5.12 beschrieben eine Cosmidbank erstellt. Durch die Untersuchungen von pMutT794/*NotI* ging eindeutig hervor, dass dieses Plasmid nicht die vollständige Sequenzinformation des Tubulysin-Biosynthesegenclusters trägt. Aus diesem Grund sollten aus der Cosmidbank von *A. disciformis* An d48 durch Hybridisierungen Cosmide identifiziert werden, die am 3'-Ende mit dem Plasmid pMutT794/*NotI* überlappen und das restliche Tubulysin-Biosynthesegencluster tragen. Dadurch sollte die gesamte Sequenz des Biosynthese-Genclusters identifiziert werden. Zur Koloniehybridisierung der Cosmidbank wurde eine gemischte Sonde aus Inserts von pASTls1 und pASTls2 (s. Tab. 2.3.2) eingesetzt. Die Fragmente wurden mit den Primerpaaren ASTls1A/B und ASTls2A/B in einer PCR-Reaktion (58°C Annealing-Temperatur) amplifiziert.

Insgesamt 16 Cosmid-Klone lieferten bei der Hybridisierung ein Signal, wurden aus der Cosmidbank isoliert und in *E.coli* XL1-Blue transformiert. Mittels PCR- und Restriktionsanalyse wurde der Bereich ihres Überlapps mit der bekannten Gencluster-Sequenz ermittelt. Bei der Restriktion wurden die Endonukleasen *Bam*HI, *Kpn*I und *Kpn*I/*Eco*RV verwendet (s. Abb. 14). In der *Kpn*I-Restriktion von pMutT794/*NotI* entstehen am bekannten 3'-Ende ein 0,6 und 6,4 kb großes DNA-Fragment. Bei einem *Kpn*I/*Eco*RV-Doppelrestriktionsansatz wird das 6,4 kb große Fragment in 1 kb und

5,4 kb große Fragmente hydrolisiert. Mit einem zusätzlichen *Bam*HI-Restriktionsansatz konnte der Bereich des Überlapps durch Vergleich der Fragmentgrößen von pMutT794/*Not*I und den zu untersuchenden Cosmiden bestimmt werden.

Die Analyse zeigte, dass die Cosmide F7 und F11 einen Überlapp von ca. 9,7-11,0 kb und F13 einen Überlapp von 7,0-9,7 kb zur charakterisierten Sequenz aus pMutT794/*Not*I besitzen. Das Cosmid F5 trägt mit ca. 23 kb Überhang den gesamten Teil des bekannten Tubulysin-Genclusters. Mit F16 konnte ein Cosmid identifiziert werden, das zum 5'-Ende mit der bekannten Sequenz aus pMutT794/*Not*I überlappt, da in der *Kpn*I-Restriktion sowohl das 6,4 wie auch 0,6 kb Fragment fehlen.

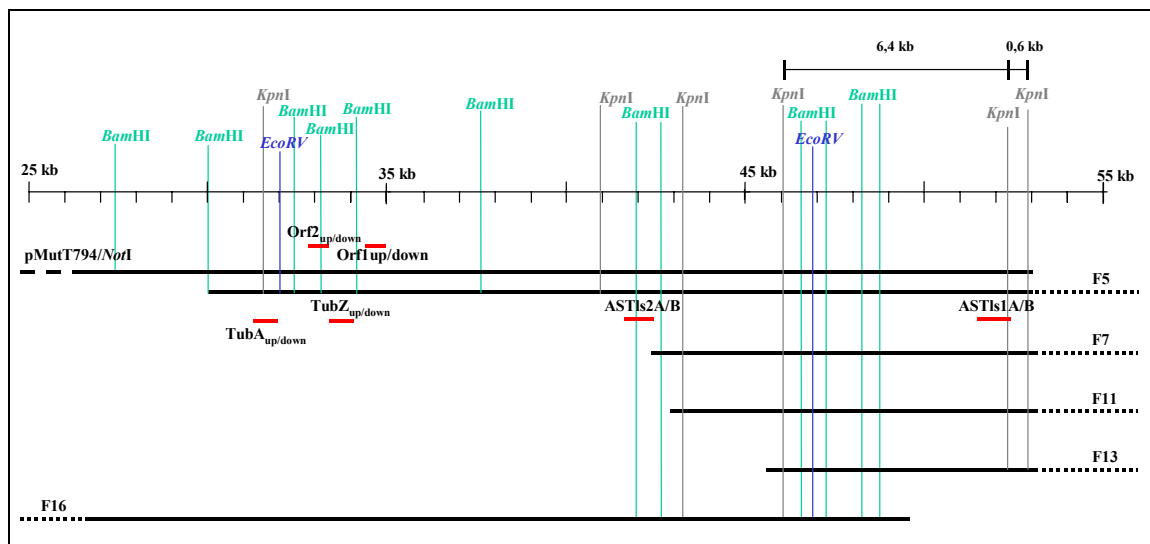


Abb. 14: PCR- und Restriktionsanalyse der Anschluß-Cosmide F5–F16. Die Abbildung zeigt die Überhänge der einzelnen Cosmide zur bekannten Sequenz aus pMutT794/*Not*I. Gezeigt sind hierbei 28 kb stromaufwärts vom 3'-Ende. Die Kartierung erfolgte durch Restriktionen mit *Bam*HI, *Kpn*I und *Kpn*I/*Eco*RV. Ebenfalls sind die Positionen der eingesetzten Primerpaare angegeben (siehe unten).

Die PCR-Analysen bestätigten die Ergebnisse der Restriktionsanalyse. Verwendet wurden dafür Primerpaare, die aus den Gensequenzen von *tubA*, *orf1*, *tubZ* und *orf2* stammen (s. Tab. 2.3.2 und Abb. 14). Zusätzlich wurden die Primerpaare ASTIs1A/B und 2A/B verwendet, um eine vollständige PCR-Analytik über das gesamte Gencluster durchführen zu können (s. Tab. 3.3.2). Aus dem Cosmid F5 konnte mit allen Primerpaaren Produkte der erwarteten Größe amplifiziert werden. Bei den Cosmiden F7, F11 und F13 wurde in der PCR-Reaktion nur ein Amplifikat mit dem Primerpaar ASTIs1A/B erhalten. Dieses Ergebnis stimmt mit den berechneten Überhängen aus der Restriktionsanalyse überein und zeigt, dass diese Cosmide hauptsächlich Anschluss-

Sequenz tragen müssen. Ebenfalls konnte durch die PCR-Analyse gezeigt werden, dass das Cosmid F16 ein DNA-Insert enthält, welches mit der bekannten Sequenz in 3'-Richtung übereinstimmt. Bei diesem Cosmid konnte ein Amplifikat mit dem Primerpaar ASTIs2A/B erhalten werden (sowie allen Primerpaaren stromaufwärts von diesem), aber nicht mit dem Primerpaar ASTIs1A/B.

Tab. 3.3.2: PCR-Analyse der Anschluß-Cosmide. Verwendet wurden Primer, die aus der bekannten Sequenz des Tubulysin-Biosynthesegenclusters abgeleitet wurden. Die Lage der einzelnen Fragmente zueinander ist in Abb. 14 dargestellt.

DNA-Probe	Verwendetes Primerpaar (Annealing-Temp. 58°C; 25 Zyklen)					
	TubA _{up/down} (560 bp)	Orf2 _{up/down} (572 bp)	TubZ _{up/down} (570 bp)	Orf1 _{up/down} (554 bp)	ASTIs2A/B (700 bp)	ASTIs1A/B (889 bp)
pMutT794/NotI	+	+	+	+	+	+
F5	+	+	+	+	+	+
F7	-	-	-	-	-	+
F11	-	-	-	-	-	+
F13	-	-	-	-	-	+
F16	+	+	+	+	+	-

3.3.7 Analyse des Tubulysin-Biosynthesegenclusters

Bei der Sequenzierung des Cosmids F11 wurden 40.591 bp neue Sequenzinformation erhalten. Die Sequenz besitzt einen Überlapp zu der bekannten DNA-Sequenz aus pMutT794/NotI von 10.107 bp. Insgesamt konnten 17.796 bp neue Sequenzinformationen vom 3'-Ende der bekannten DNA-Sequenz erhalten werden. Das Cosmid F11 enthält neben diesem erwarteten Sequenzabschnitt zusätzlich noch 12.687 bp, die nicht colinear mit dem Genom vorliegen. Der Abbruch der Colinearität und damit die Abweichung der Sequenzen, stimmt mit einer *Sau3A*-Schnittstelle überein. Durch eine unvollständige Dephosphorylierung der mit *Sau3A* partial hydrolysierten chromosomalen DNA während der Erstellung der Cosmidbank aus *A. disciformis* An d48 muss es zu einer Verknüpfung nicht zusammen gehörender DNA-Fragmente vor der Phagen-Verpackung gekommen sein. Dies konnte durch eine Sequenzauswertung und anschließende Southern-Blot Analyse bewiesen werden. In Abb. 15 ist das Alignment der beiden DNA-Sequenzen zu sehen. Durch die Annotation der verbleibenden 17.796 bp konnte der fehlende Teil des Strukturgens *tubD* identifiziert werden. Am

3'-Ende von *tubD* wurden zwei weitere Gene entdeckt, die für eine NRPS (*tubE*) und eine PKS (*tubF*) codieren.

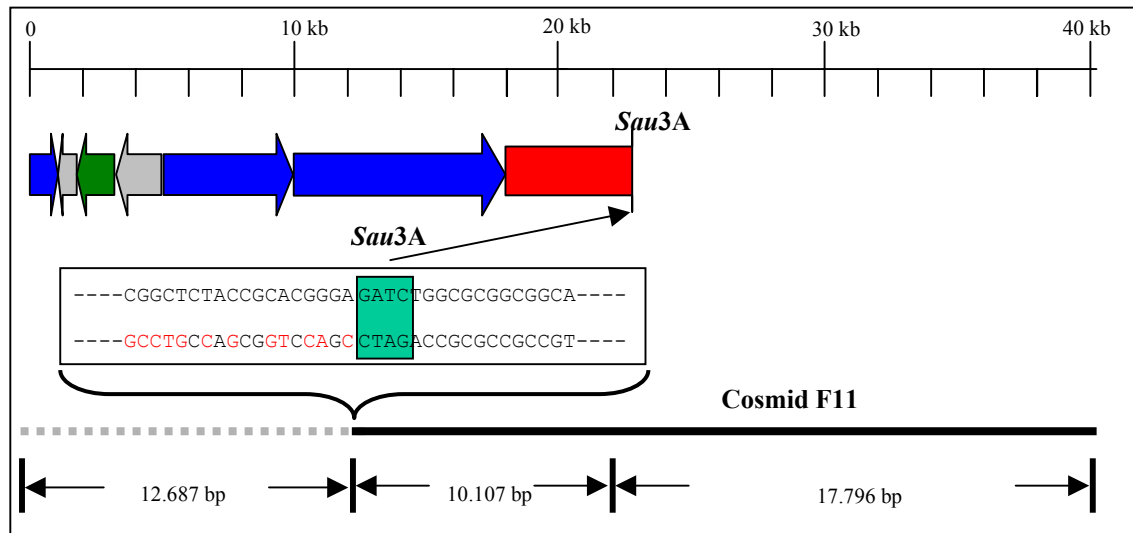


Abb. 15: Alignment des bekannten Anteils des Tubulysin-Genclusters mit der Sequenz von Cosmid F11. Cosmid F11 enthält die genetische Information des fehlenden Anteils des Tubulysin-Biosynthesegenclusters. Gezeigt sind dabei der Überlapp und die neu erhaltene Sequenz. Zusätzlich enthält das Cosmid nach einer *Sau3A*-Restriktionsstelle einen Sequenzanteil von 12.687 bp, der nicht mit der bekannten Sequenz übereinstimmt (grau gestrichelt dargestellt). Die abgebildete Sequenzabfolge zeigt ausschnittsweise den Abbruch der Colinearität ab dieser *Sau3A* Schnittstelle.

Die Sequenzierung des Plasmids pMutT794/*NotI* und des Cosmids F11 erbrachten insgesamt 70.782 bp Sequenzinformation, von denen ca. 40 kb am 3'-Ende das Tubulysin-Biosynthesegencluster codieren. In diesem Sequenzabschnitt wurden neun offene Leserahmen identifiziert, von denen die als *tubA-tubF* bezeichneten Gene die gleiche Leserichtung aufweisen (s. Abb. 16). Die Gene *tubZ* sowie *orf1* und *orf2* weisen eine inverse Leserichtung auf. Zur Definition des jeweiligen Startcodons dieser Gene wurde neben ATG (codiert für Methionin) ebenfalls das Codon GTG berücksichtigt. Des weiteren wurden die möglichen Ribosomenbindestellen (RBS) nach Shine und Dalgarno (1975) definiert. Die Charakteristika der einzelnen Strukturgene sind in Tab. 3.3.3 (S. 95) zu sehen. Der GC-Gehalt des gesamten Tubulysin-Biosynthesegenclusters beträgt mit 70,5%, einen für myxobakterielle Gene kennzeichnenden Wert (Mc Curdy & Wolf, 1967; Mandel & Leadbetter, 1965). Ebenso stimmt der charakteristische GC-Gehalt an 1., 2. und 3. Position der codierenden Tripletts der einzelnen ORFs mit denen typischer myxobakterieller Gene überein.

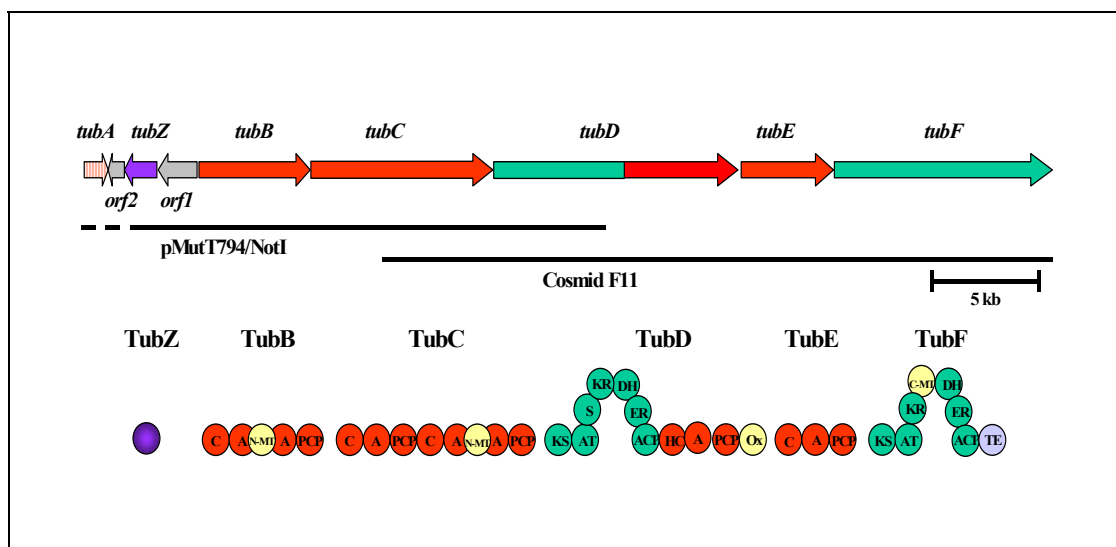


Abb. 16: Genanordnung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters. Die Pfeile geben die Transkriptionsrichtung der Gene an. Die Funktion der Genprodukte von, *orf2* und *orf1* (grau) sind für die Tubulysin-Biosynthese unbekannt. Das Gen *tubA* (rot gestreift) kodiert eine unvollständige NRPS und *tubZ* (lila) kodiert eine Lysin-Cyclodeaminase. PKS-Module sind grün und NRPS-Module rot dargestellt. In den gleichen Farben sind PKS-Domänen durch grüne und NRPS-Domänen durch rote Kreise symbolisiert. Die TE Domäne ist in blau dargestellt. In der Abbildung ist das Plasmid pMutT794/NotI und das Cosmid F11 eingezeichnet (schwarze Balken). C: Kondensationsdomäne, A: Adenylierungsdomäne, N- bzw. C-MT: N- bzw. C-Methyltransferase-Domäne, PCP: Peptidyl Carrier Protein, HC: Heterozyklisierungsdomäne, Ox: Oxidationsdomäne, KS: β -Ketoacylsynthase AT: Acyltransferase, KR: β -Ketoacylreduktase-Domäne, DH: β -Hydroxy-Dehydratase-Domäne, ER: Epimerisierungsdomäne, ACP: Acyl Carrier Protein, S: Spacer-Region, TE: Thioesterasedomäne.

3.3.8 Definition der Tubulysin-Strukturgene

Das Tubulysin-Biosynthesegencluster beginnt mutmaßlich mit dem Gen *tubA*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt eindeutige Homologien zu NRPSs. Mit einer Größe von 1173 bp handelt es sich um eine ungewöhnlich kleine NRPS, die nicht funktionsfähig zu sein scheint (s. 3.3.10.1). Eine mögliche RBS liegt 3 bp (5'-AGGG-3') vor dem Startcodon GTG. Ein mögliches alternatives GTG-Startcodon liegt 15 bp stromaufwärts und besitzt eine RBS 7bp (5'-AGGA-3') von diesem entfernt. Das Gen *tubZ* liegt 1782 bp stromabwärts von *tubA* und besitzt eine inverse Transkriptionsrichtung zu diesem. Eine RBS nach der Definition von Shine und Dalgarno (3'-GAGG-5') liegt 6 bp vor dem ATG-Startcodon. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt hohe Homologien zu einer Lysin-Cyclodeaminase. Für ein ähnliches Gen (*rapL*) wurde in der Rapamycin-Biosynthese gezeigt, dass es für die Bildung von Pipecolinsäure benötigt wird (Molnar *et al.*, 1996). Der offene Leserahmen

stromaufwärts von *tubZ* codiert für ein Protein (Orf2) mit unbekannter Funktion. Das ATG-Startcodon liegt 664 bp entfernt von *tubA* und das Gen wird ebenfalls am anderen Strang der DNA-Doppelhelix transkribiert. Eine RBS (3'-AAGG-5') könnte 6 bp vor dem Startcodon liegen. Obwohl dem Gen *orf2* keine Funktion zu zuweisen ist, müsste es sich aufgrund des hohen GC-Gehalts (s. Tab. 3.3.3) um einen kodierenden Leserahmen handeln. Dem Genprodukt von *orf1* ist ebenfalls keine offensichtliche Funktion für die Tubulysin-Biosynthese zu zuweisen. Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt hohe Homologien zu einem ATP-abhängigen Anionentransporter und das Gen wird wiederum in inverser Richtung zu *tubA* transkribiert. Das Startcodon liegt 1248 bp stromabwärts vom Start von *tubZ* und eine wahrscheinliche RBS (3'-GGGA-5') liegt 7 bp entfernt von diesem.

1326 bp stromabwärts von *tubZ* liegt das 4626 bp umfassende Gen *tubB*. Das Gen wird in die gleiche Richtung wie *tubA* transkribiert und weist 11 bp vor dem ATG-Startcodon eine mögliche RBS (5'-GGTG-3') auf. Die von *tubB* abgeleitete Primärstruktur zeigt Homologien zu NRPSs. Das Stopcodon von *tubB* überlappt mit dem Startcodon des nächsten Gens *tubC*, das ebenfalls für eine NRPS kodiert. Dieses Gen startet vermutlich mit dem Codon TTG und umfasst 7878 bp. Eine mögliche RBS (5'-AGGA-3') liegt 8 bp vor dem Startcodon. Das folgende Gen *tubD* überlappt mit dem Stopcodon des vorhergehenden Gens *tubC*. Dieser Leserahmen ist insgesamt 10548 bp groß und startet mit einem ATG-Codon. 7 bp vor dem Startcodon liegt eine mögliche RBS (5'-GGGA-3'). Das Besondere an *tubD* ist, dass es sowohl für eine PKS als auch für eine NRPS kodiert. Die wenigen bekannten Beispiele solcher Hybride, bei denen PKS und NRPS in einem ORF liegen, sind zumeist aus Myxobakterien bekannt [MtaD und MelD (Weinig *et al.*, 2003b; Silakowski *et al.*, 1999)]. Der Start des folgenden Gens *tubE* besitzt wie die vorhergehenden Gene *tubC* und *tubD* einen Überlapp mit dem stromaufwärts liegenden Gen. 8 bp vor dem ATG-Startcodon liegt eine mögliche RBS (5'-AAGG-3'). Datenbankvergleiche der Aminosäuresequenz zeigten hohe Ähnlichkeiten zu NRPSs. Der Überlapp der vier Gene *tubB-E* könnte eine transkriptionale Kopplung als Operon anzeigen. Das letzte Gen liegt 6 bp entfernt von *tubE*. Dieses Gen *tubF* besitzt zehn Nukleotide vor seinem ATG-Startcodon eine RBS (5'-GAGGA-3'). Die abgeleitete Aminosäuresequenz zeigt Ähnlichkeiten zu PKSs. Mit

einer Gesamtgröße von 8514 bp ist *tubF* das größte bis dahin bekannte Gen, dass für ein einziges PKS-Modul kodiert.

Tab. 3.3.3: Die abgeleiteten Funktionen der im Tubulysin-Biosynthesegencluster kodierten Proteine. Die Bedeutung der einzelnen Abkürzungen sind in der Legende von Abb. 16 angegeben.

Gen	Größe in bp; GC-Gehalt in 1., 2. und 3. Position in %; Größe des abgeleiteten Proteins	Funktion bzw. Domänen (und ihre Position in der Proteinsequenz)	Position in der Nukleotidsequenz
<i>tubA</i>	1.173 bp (70,3 / 48,9 / 73,3) 43.202 Da	Ähnlichkeit zu C-Domänen (Kernmotive C2-C3)	31.220 – 32.392
<i>orf2</i>	660 bp (66,2 / 41,5 / 83,1) 25.390 Da	Unbekannte Funktion	33.056 – 32.397
<i>tubZ</i>	1.101 bp (72,7 / 48,9 / 73,3) 39.764 Da	Lysin-Cyclodeaminase "Pipicolinsäuresynthase"	34.174 – 33.074
<i>orf1</i>	1.218 bp (64,4 / 38,5 / 83,5) 46.030 Da	ATP abhängiger Anionen Transporter	35.422 – 34.205
<i>tubB</i>	4.626 bp (77,1 / 47,4 / 87,3) 170.704 Da	NRPS C (76 – 416) A (555 – 1432) N-MT (950 – 1403) PCP (1433 – 1516)	35.471 – 36.769 37.184 – 39.817 38.369 – 39.730 39.818 – 40.069
<i>tubC</i>	7.878 bp (78,3 / 47,9 / 88,1) 289.141 Da	NRPS C (77 – 418) A (561 – 1024) PCP (1025 – 1106) C (1137 – 1477) A (1613 – 2496) N-MT (2004 – 2468) PCP (2497 – 2575)	40.372 – 41.398 41.824 – 43.215 43.216 – 43.461 43.552 – 44.574 44.980 – 47.631 46.156 – 47.547 47.632 – 47.868
<i>tubD</i>	10.548 bp (77,3 / 50,3 / 87,4) 383.778 Da	PKS, NRPS KS (1 – 437) AT (538 – 858) S (861 – 1151) KR (1155 – 1433) DH (1452 – 1648) ER (1686 – 1990) ACP (2050 – 2150) HC (2151 – 2620) A (2664 – 3134) PCP (3135 – 3211) Ox (3218 – 3516)	48.011 – 49.321 49.622 – 50.584 50.594 – 51.463 51.473 – 52.309 52.367 – 52.954 53.066 – 53.980 54.158 – 54.460 54.461 – 55.870 56.000 – 57.412 57.413 – 57.643 57.662 – 58.558
<i>tubE</i>	3.546 bp (75,7 / 48,6 / 87,5) 130.337 Da	NRPS C (47 – 388) A (536 – 1049) PCP (1050 – 1139)	58.689 – 59.714 60.156 – 61.697 61.698 – 61.967
<i>tubF</i>	8.514 bp (77,0 / 50,4 / 86,1) 309.369 Da	PKS KS (9 – 406) AT (537 – 858) KR (953 – 1260) C-MT (1295 – 1653) DH (1714 – 1909) ER (2049 – 2342) ACP (2420 – 2501) TE (2553 – 2828)	62.127 – 63.320 63.711 – 64.676 64.959 – 65.882 65.985 – 67.061 67.242 – 67.829 68.247 – 69.128 69.360 – 69.605 69.759 – 70.586

3.3.9 Identifizierung der Anschluss-Sequenz des Tubulysin-Biosynthesegenclusters

In Abb. 16 sind die identifizierten Strukturgene des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *A. disciformis* An d48 abgebildet, sowie die von ihnen abgeleiteten Enzyme. Die Abfolge dieser Gene korreliert dabei weitgehend mit den hypothetischen Syntheseschritten, die für die Bildung der bekannten Tubulysin-Struktur nötig wären (s. Diskussion 4.3, S.139). Aufgrund der Struktur fehlen jedoch in diesem Gencluster die genetischen Informationen für weitere Enzyme, die das vollständige Tubulysin-Molekül synthetisieren könnten (s. Abb. 17). Im Tubulysin sind zwei weitere Acylreste über eine Esterbindung kovalent an das Molekül gebunden. Diese Substitutionen könnten über je eine Hydroxylierung und nachfolgende Übertragung eines Acylrestes erfolgen. In der bekannten Gencluster-Sequenz fehlen daher hypothetisch jeweils zwei Monooxygenasen und zwei Acyltransferasen.

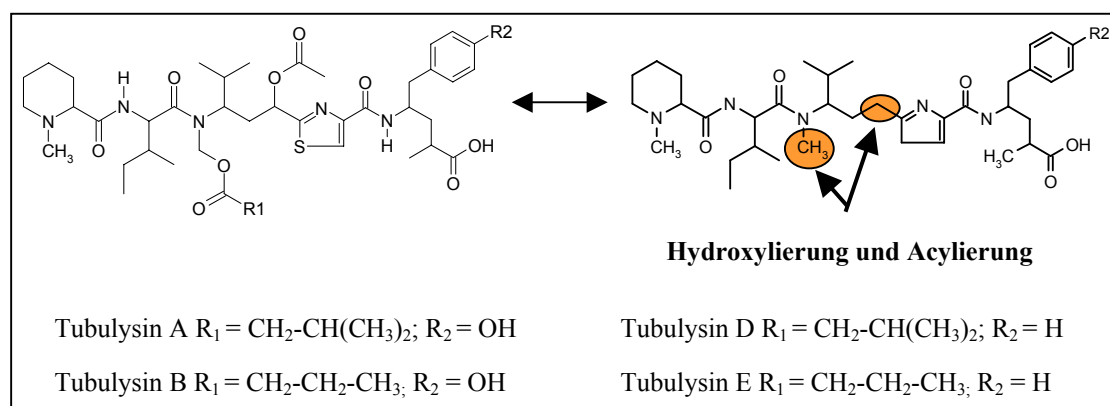


Abb. 17: Vergleich der Tubulysin-Struktur mit der hypothetischen Tubulysin-Grundstruktur, die vermutlich synthetisiert wird. Auf der linken Seite ist die Struktur der Tubulysine abgebildet (Sasse *et al.*, 2000). Auf der rechten Seite ist das Tubulysin-Molekül zu sehen, wie es vermutlich durch den Enzymkomplex primär gebildet wird (s. Diskussion 4.3, S. 139).

Aufgrund dieser Annahme wurden die Inserts der bereits bekannten Cosmide F7 und F13 auf neue DNA-Sequenz am 3'-Ende des Clusters hin untersucht, um Sequenzinformationen stromabwärts von *tubF* zu erhalten. Diese Cosmide zeigten nach den Restriktionsanalysen (s. Abb. 14) einen ähnlich großen Überlapp mit dem ersten Teil des Biosynthesegenclusters aus pMutT794/*NotI*, wie das sequenzierte Cosmid F11. Die Sequenzanalyse des DNA-Inserts aus Cosmids F11 zeigte aber, dass an dessen 5'-Ende ca. 12 kb DNA-Sequenz vorhanden sind, die nicht aus diesem genomischen

Bereich von *A. disciformis* An d48 stammen und einen Abbruch in der Colinearität bedeuten (s. 3.3.7). Da solch ein Rearrangment bei den Cosmids F7 und F13 nicht erwartet wurde, sollten diese Cosmids weitere Sequenzinformationen über das Gen *tubF* hinaus tragen und somit zur Identifizierung der fehlenden Gene beitragen können.

3.3.9.1 Southern Blot Analyse der Cosmids F7 und F13

Für die Identifizierung des Cosmids wurden Restriktionsenzyme ausgewählt, die möglichst selten und bevorzugt am Ende der bekannten Genclustersequenz die DNA hydrolysieren. Als geeignet erwiesen sich *NdeI* und *NsiI*, mit Restriktionserkennungssequenzen an den Positionen 39306 bp bzw. 39430 bp. Beide Enzyme weisen nur eine weitere Schnittstelle in der bekannten Sequenz auf. Durch eine über PCR mit den Primern *Tls_{up/down}* (s. Tab. 2.3.4) hergestellte Sonde, die direkt hinter den Restriktionsstellen am Ende der bekannten Genclustersequenz hybridisiert, sollten die Cosmids untersucht werden. Die Cosmids wurden dafür in verschiedenen Doppelrestriktionsansätzen mit *NdeI* und *NsiI* hydrolysiert. Für diese Doppelrestriktionen wurden die Restriktionsendonukleasen *BamHI*, *EcoRI*, und *NotI* ausgewählt. Durch die Kombinationen mit *EcoRI* und *NotI* sollte erreicht werden, dass ein großes Fragment entsteht, das eventuell bis ans Ende des jeweiligen Cosmid-Inserts reicht. Falls dieses Fragment für eine nachfolgende Klonierung zu groß sein sollte, wurde ebenfalls das Restriktionsenzym *BamHI* verwendet um eventuell kleinere Fragmente zu erhalten.

Das Ergebnis dieser Analyse war, dass beim *EcoRI/NsiI*-Restriktionsansatz des Cosmids F7 ein 12 kb großes Fragment in den Hybridisierungen detektiert wurde. Dieses Fragment muß die Anschluss-Sequenz des Tubulysin-Genclusters tragen und reicht bis zum Ende der Insert-Sequenz des Cosmids. Dies kann aus den Restriktionsanalysen und dem charakterisierten Überlapp mit der Tubulysin-Genclustersequenz geschlossen werden (s. Abb. 18). Das detektierte *NotI/NsiI*-Fragment ergab eine Größe von 4,2 kb. Daher muss in der 12 kb Insertsequenz von F7–zwischen Anfang (*NsiI*-Restriktionsstelle) und Vektor (Scos)–mindestens eine weitere *NotI*-Schnittstelle liegen. Die Anschluss-Sequenz könnte daher in kleineren Fragmenten, als *NsiI/NotI*- und *NotI/NotI*-Fragment kloniert und sequenziert werden. Das detektierte *BamHI*-Fragment

war bei Cosmid F7 250 bp kurz. Dieses 250 bp große Fragment wurde ebenfalls bei allen Restriktionsansätzen für das Cosmid F11 detektiert. In diesem Cosmid liegt die *Sau3A*-Restriktionsstelle in einer *Bam*HI-Erkennungs-sequenz, wodurch alle drei Restriktionsenzyme in Kombination mit *Nsi*I ein Signal von 250 bp zeigen müssen, da das Ende der Insertsequenz erreicht ist.

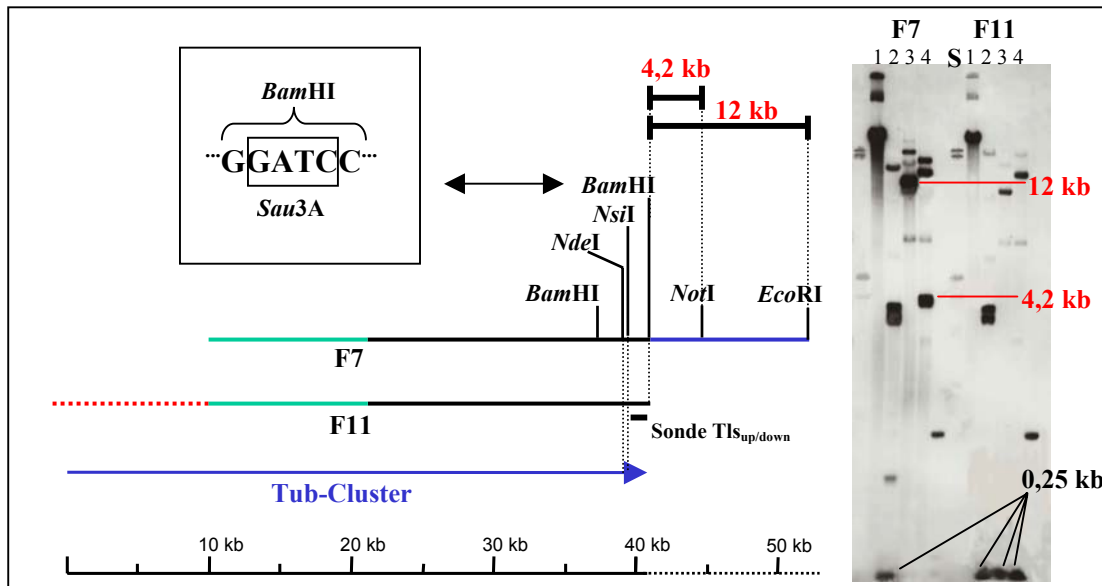


Abb. 18: Southern-Blot Analyse der Cosmide F7 und F11. Aufgrund der Hybridisierungsergebnisse mit der Gensonde *Tls_{up/down}* sowie vorhergehenden Restriktions- und PCR-Analysen (s. Abb. 16) kann die Größe der Anschluss-Sequenz zum 3'-Ende des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in Cosmid F7 bestimmt werden. F7 sollte demnach ein ca. 12 kb großes Fragment enthalten, dass die Anschluss-Sequenz zum Tubulysin-Gencluster enthält. Die rot markierte Sequenz von F11 (12,6 kb) deutet den Abbruch der Homologie zum Gencluster an (s. 3.3.7). Auf der rechten Bildseite ist der dazugehörige Southern-Blot zu sehen. Die verschiedenen Restriktionsansätze sind: (1) *Nsi*I (2) *Nsi*I/*Bam*HI (3) *Nsi*I/*Eco*RI (4) *Nsi*I/*Not*I. Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte mit dem (S) DIG-markierten Größenstandard III der Fa. Roche Diagnostics. Die *Sau*3A-Restriktionsstelle am 3'-Ende des DNA-Insert aus F11 liegt in einer *Bam*HI-Erkennungssequenz, wodurch in allen Restriktionsansätzen in Kombination mit *Nsi*I ein ca. 250 bp Fragment entsteht. Die Signale bei 4 kb in den jeweiligen *Nsi*I/*Bam*HI-Restriktionen sind durch eine unvollständige *Nsi*I-Hydrolyse entstanden.

3.3.9.2 Klonierung und Sequenzierung der Tubulysin-Gencluster Anschlusssequenz aus dem Cosmid F7

Es war anzunehmen, dass die gesuchten Gene innerhalb der 12 kb im Anschluß an die von Cosmid F11 erhaltene Sequenz liegen. Dieses 12 kb Fragment wurde aus Cosmid F7 isoliert, kloniert und anschließend sequenziert, um die eventuell fehlenden Gene des Genclusters zu identifizieren. Dazu wurde das Cosmid F7 *Nsi*I/*Eco*RI gespalten und das gewünschte Fragment isoliert. Zur Kontrolle wurde das Fragment mit *Not*I erneut

hydrolysiert, um die erzielten Hybridisierungsergebnisse zu bestätigen (s. 3.3.9.1). Zusätzlich sollte so überprüft werden, ob weitere *NotI*-Erkennungssequenzen innerhalb der 12 kb Anschluss-Sequenz liegen, um die Anzahl der zu klonierenden Teilfragmente bestimmen zu können. Die Analyse ergab ein 4,2 kb *NsiI/NotI*-Fragment und 8 kb großes *NotI/NotI*-Fragment. Dies bestätigte die Ergebnisse der durchgeführten Hybridisierung. Das 12,2 kb große *NsiI/EcoRI*-Fragment wurde in den Vektor pUC18 (*PstI/EcoRI*) kloniert. *PstI* und *NsiI* besitzen kompatible Restriktionsstellen, so dass nach erfolgreicher Klonierung diese nicht mehr vorhanden sind. Mittels *HindIII* bzw. *NdeI* und *EcoRI* kann in einer Doppelrestriktion das 12 kb Insert wieder aus dem pUC18-Derivat pASM12 isoliert werden.

Die erhaltenen Klone wurden so auf ihre Richtigkeit hin überprüft. Des weiteren wurde die Kolinearität mit dem Chromosom kontrolliert. Dazu wurden die Klone und die chromosomale DNA von *A. disciformis* An d48 mit verschiedenen Enzymkombinationen hydrolysiert. Für die folgende Hybridisierung wurde wiederum das markierte Tls_{up/down} Fragment verwendet. Das Ergebnis dieser Analyse nach Southern zeigte eindeutig die Kolinearität des 12 kb Fragments zum Chromosom. Das Plasmid pASM12 sollte daraufhin sequenziert werden. Dazu wurde das GPSTM-1 Genome Priming System genutzt (s. 2.5.19). Durch eine *in vitro* Transposon konnte somit eine Transposonbank aus pASM12 von 192 Klonen erzeugt und diese zum Sequenzieren (384 Sequenzläufe) abgegeben werden.

3.3.9.3 Analyse der Anschluss-Sequenz des Tubulysin-Biosynthesegenclusters

Die erhaltene Anschluss-Sequenz an das Tubulysin-Biosynthesegencluster ist 12.219 bp lang und hat einen Überlapp mit der bekannten Sequenz von 131 bp. In dieser Sequenz ist von Basenpaar 6416-6898 (Position 76.787-77.545 bp in der Gesamtsequenz) ein offener Leserahmen codiert, der Ähnlichkeiten zu Acyltransferasen zeigt. Dieses Gen könnte für die Modifikation des Tubulysins eine Rolle spielen und wurde mit *tubG* bezeichnet. Die anderen identifizierten ORFs scheinen aufgrund ihrer Ähnlichkeiten keine direkte Funktion für die Tubulysin-Biosynthese zu haben. Ob die verschiedenen identifizierten hypothetischen Regulatoren Einfluss auf die Biosynthese haben, bleibt ungeklärt. In Tab. 3.3.4 sind die Homologien der einzelnen ORFs aus diesen 12,2 kb

angegeben, die durch Sequenzvergleiche gegen bestehende Datenbanken ermittelt wurden. Ebenfalls sind die Ergebnisse für die stromaufwärts liegende Region zum Tubulysin-Biosynthesegencluster angegeben (s. Abb. 12). Insgesamt wurden 82.868 bp Sequenzinformation aus dem Genom von *A. disciformis* An d48 erhalten. In dieser Sequenz liegt das Tubulysin-Biosynthesegencluster von Basenpaar 31.219-70.616 codiert. Die flankierenden Bereiche sind stromaufwärts 31.218 bp und stromabwärts 12.242 bp groß. Innerhalb der gesamten Sequenz konnte kein weiterer Leserahmen identifiziert werden, der Ähnlichkeiten zu Acyltransferasen oder Monooxygenasen zeigte.

Tab. 3.3.4: Sequenzauswertung der flankierenden Bereiche des Tubulysin-Biosynthesegenclusters.

In dieser Tabelle sind alle Leserahmen angegeben, die innerhalb der 82.868 bp durch Analysen der abgeleiteten Aminosäuresequenzen identifiziert wurden, sowie die resultierenden Identitäten [I] und Ähnlichkeiten [Ä] zu den jeweiligen Proteinen in Prozent. Bis auf das Gen *tubG*, das für eine Acyltransferase kodiert, haben diese ORFs wahrscheinlich keine direkte Funktion in der Biosynthese des Tubulysins. Die stromaufwärts liegenden ORFs vom Biosynthesegencluster wurden mit *orf16-orf3* bezeichnet. Die stromabwärts lokalisierten ORFs wurden dieser Nomenklatur folgend *orf17-24* genannt.

Gen	Größe in bp; GC-Gehalt in 1., 2. und 3. Position in %; Größe des abgeleiteten Proteins	Homologien zu [Organismus]	I [in %]	Ä [in %]	Position in der Nucleotidsequenz
<i>orf16</i>	3308 bp 45,7/65,5/97,9 122434 Da	Valyl-tRNA Synthetase [<i>Thermotoga maritima</i>]	54	69	3308 - 1
<i>orf15</i>	1254 bp 79,6/67,8/86,6 41337 Da	Regulator CheY Unterfamilie [<i>Synechocystis</i> sp.]	36	60	4706 - 3453
<i>orf14</i>	1446 bp 75,0/45,9/95,8 52449 Da	“response” Regulator Protein [<i>Geobacter sulfurreducens</i>]	36	56	5719 - 7164
<i>orf13</i>	2241 bp 90,5/56,3/68,3 83814 Da	Sensorkinase / “response” Regulator-Hybrid [<i>Agrobacterium tumefaciens</i>]	29	47	9557 - 7317
<i>orf12</i>	1644 bp 64,5/39,2/96,7 58650 Da	Hitzeschockprotein GroEL [<i>Geobacter sulfurreducens</i>]	70	84	12193 - 10550
<i>orf11</i>	1644 bp 78,6/40,7/95,1 58650 Da	hypothetisches Protein [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	33	53	12193 - 10550
<i>orf10</i>	999 bp 68,7/48,3/93,0 36441 Da	Zucker-Epimerase [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	65	79	14833 - 13835
<i>orf9</i>	645 bp 69,7/43,0/95,3 23789 Da	Transkriptionsregulator, TetR Familie [<i>Caulobacter crescentus</i>]	30	52	14942 - 15586
<i>orf8</i>	1137 bp 64,2/48,6/89,9 41614 Da	hypothetisches Protein [<i>Myxococcus luteus</i>]	25	29	15847 - 16983

Gen	Größe in bp; GC-Gehalt in 1., 2. und 3. Position in %; Größe des abgeleiteten Proteins	Homologien zu [Organismus]	I [in %]	Ä [in %]	Position in der Nucleotidsequenz
orf7	2346 bp 63,4/40,3/81,9 89255 Da	hypothetisches Protein [<i>Nostoc punctiforme</i>]	28	46	21154 - 18809
orf6	1157 bp 69,9/43,1/93,3 43228 Da	Serin/Threonin-Kinase Pkn14 [<i>Myxococcus xanthus</i>]	33	47	22366 - 23532
orf5	1923 bp 73,6/51,7/80,5 68825 Da	Proteinkinase [<i>Stigmatella aurantiaca</i>]	42	57	24591 - 26513
orf4	921 bp 68,7/47,7/75,1 33507 Da	Adenindeaminase verwandtes Protein [<i>Deinococcus radiodurans</i>]	33	38	26597 - 27517
orf3	543 bp 66,1/38,3/73,3 20880 Da	mögliche Cytosindeaminase [<i>Salmonella typhimurium</i>]	32	46	29858 - 30400
Tubulysin-Biosyntheseegencluster					31219 - 70616
orf17	1056 bp 64,7/44,2/84,4 38371 Da	Patatin ähnliches Protein [<i>Anabaena sp.</i> 90]	23	39	71640 - 70584
orf18	1056 bp 64,9/51,0/85,2 38371 Da	Patatin ähnliches Protein [<i>Anabaena sp.</i> 90]	24	40	72786 - 71731
orf19	555 bp 70,1/59,4/89,4 20040 Da	hypothetisches Protein [<i>Azotobacter vinelandii</i>]	29	35	75209 - 74655
orf20	1158 bp 53,2/46,5/86,8 43282 Da	hypothetisches Protein [<i>Microbulbifer degradans</i>]	41	62	75488 - 76645
tubG	759 bp 74,6/48,4/93,3 28039 Da	N-Hydroxyarylamine O-Acetyltransferase [<i>Streptomyces avermitilis</i>]	47	53	76787 - 77545
orf21	927 bp 56,9/45,8/93,2 33859 Da	hypothetisches Protein [<i>Xanthomonas axonopodis</i>]	28	39	77769 - 78695
orf22	882 bp 72,0/46,7/89,8 32668 Da	hypothetisches Protein [<i>Rhizobium etli</i>]	37	49	79138 - 80019
orf23	1263 bp 65,3/46,0/88,5 49133 bp	hypothetisches Protein [<i>Nostoc punctiforme</i>]	49	67	81319 - 80057
orf24	1077 bp 78,8/53,1/79,5 37621 Da	Carboxylatreductase NosF [<i>Nostoc sp.</i>]	31	44	82797 - 81721

3.3.10 Analyse der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Domänen

3.3.10.1 Analyse der Kondensationsdomänen

C-Domänen katalysieren die Bildung von Peptidbindungen, indem sie das wachsende Intermediat mit der nächsten Aminosäure verknüpfen. Durch Vergleiche der Aminosäuresequenzen verschiedener C-Domänen konnten in diesen sieben verschiedene Konsensusmotive identifiziert werden (Konz & Marahiel, 1999). Im Tubulysin-Biosynthesegencluster sind insgesamt fünf C-Domänen enthalten. In TubB-TubE wurden die für diesen Domärentyp definierten Konsensusmotive identifiziert. Im Gegensatz dazu zeigt die C-Domäne aus TubA nur geringe Homologien in den Kernmotiven C1 und C2 (s. Abb. 19). Die restlichen fünf Motive sind in TubA nicht vorhanden. Sequenzvergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz zeigen aber eindeutige Homologien zu C-Domänen. TubA enthält keine weiteren Domänen nichtribosomaler Peptidsynthetasen.

	<u>C1</u>	<u>C2</u>	<u>C3</u>		<u>C4</u>	<u>C5</u>	<u>C6</u>	<u>C7</u>
Konsensus	LY SxAQxRMWxL	RHExLRTxF	MHHxISDG----WS		Y YxDFAVW	V L IGxFVNTQ~xR	N Y HQDVPFE	RDxSRNPL
TubA C	VALQRRHPLLR ^{AK}	QHVEAELDRPFNS	LGAAVRRGSSALLRLSPT		LARLLARCRE	MLALSNVGRVEIA	FAQRLEASF	QREQVEQLA
TubB C	SSSQRRMWFL ^{EQ} L	VKRHEALRLVVAI	TLHHLISDGA---WSCEV		VQYRDYAGWE	LIGYFGTPVALRS	AHAALPFER	ARSPSRHPL
TubC C1	SFAQQRLWFQ ^{EQ} L	VRRHEALRTTLGE	SLHHIAADG----VGLQV		LQVADLADWQ	ILGFLNIVLLRL	AHQELPFEH	GSE ^{RG} DSSL
TubC C2	SFAQQRLWFLQ ^Q L	VRRHEALRTTFEP	ELHHIVGDG----WSLSV		VQYADFALWQ	LIGFFVNTLVLR ^T	AHQELPFER	ERQANQNPL
TubE C	SSAQRRMWFLQ ^Q L	VRRHEPLRTVFPS	ATHHIAADG----WSLGV		LQYADFAAWE	LIGCFAS ^T TLVLRA	EHQEV ^P FER	RRRMDRHPL

Abb. 19: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten C-Domänen. In der oberen Hälfte der Abbildung sind die Sequenzen der C-Domänen nur in den Bereichen der hochkonservierten Motive abgebildet (Konz & Marahiel, 1999), wobei übereinstimmende AS grau unterlegt sind. Die C-Domäne von TubA weist dabei nur geringe Homologien in den Kernmotiven C1 und C2 auf. Homologievergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz von TubA zeigten mit dem Programm NP Biogene (<http://www.npbiogene.com>) aber die Detektion einer C-Domänen.

3.3.10.2 Analyse der Adenylierungsdomänen

A-Domänen wählen durch ihre Substratspezifität eine bestimmte Aminosäure für die Inkorporation in das wachsende Intermediat aus und aktivieren diese unter ATP-Hydrolyse zum Aminoacyladenylat. Innerhalb der A Domänen wurden 10 verschiedene hochkonservierte Konsensusmotive identifiziert (Konz & Marahiel, 1999). Diese definierten Kernmotive von A1-A10 konnten in den A Domänen von TubB-TubE lokalisiert werden. Eine Abweichung von der allgemeinen Konsensussequenz ist in Motiv A2 zu sehen. In diesem Motiv ist bei sämtlichen A-Domänen die hochkonservierte Aminosäure Leucin deletiert. In der A-Domäne von TubE ist die Sequenzabfolge der Aminosäuren in den Kernmotiven nicht sehr hoch konserviert. Die Motive A1-A10 können aber dennoch eindeutig zugeordnet werden.

	<u>A1</u>	<u>A2</u>	<u>A3</u>	<u>A4</u>
Konsensus	S LTYxEL	L I LKAGxAYLVPLD	T LAYxxYTSGSTGxPKG	FDxS
TubC A1	G	Q AY	VI	AA
TubC A2	A	AY	VLF	A
TubB A	EQ	W GF	VIH	IC
TubD A	G	Q A AY	VI	L
TubE A	WTLPEL	VLAGVAP-LVLP	VALLNLTSGETTGKAKC	GALS
	<u>A5</u>	<u>A6</u>	<u>A7</u>	
Konsensus	NxYGPTE	V GELxIxGxGLARGYL	K YRTGDL	
TubC A1	HV	VYLG D L W		
TubC A2	G	LVG P W		
TubB A	Q S	VFLG PA		
TubD A	SLG A	Y G E E W		
TubE A	AAW M	RIQVR EMISP Y	LE Q	
	<u>A8</u>	<u>A9</u>	<u>A10</u>	
Konsensus	GRxDxQVKIRGxRIELGEIE	I LPxYMVP	L NGKVDR	
TubC A1	V R L F V PA	VA V		
TubC A2	V H L V F P	VC A		
TubB A	Q M A Y P	VA VAA	T EV	
TubD A	E L VQ F V	VA A	IA	
TubE A	AKDL I H TNFSCY	AVFF	G R	

Abb. 20: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten A-Domänen. Abgebildet sind nur die Sequenzabschnitte der hochkonservierten Konsensusmotive A1-A10 (Konz & Marahiel, 1999). In Motiv A2 fehlt bei allen A-Domänen im Vergleich zur Konsensussequenz das hochkonservierte Leucin (blau markiert). Die grau unterlegten Aminosäuren der jeweiligen Motive stimmen dabei mit der Konsensussequenz überein.

Durch eine Kristallstrukturanalyse der Phenylalanin spezifischen A-Domäne aus der Gramicidin S Peptidsynthetase GrsA aus *Bacillus brevis* (Conti *et al.*, 1997) konnte erstmals die Substratbindungsstelle dieser Domänen identifiziert werden. Solche Bindungsstellen bestehen in der Regel aus einer Einkerbung auf der Oberfläche des Enzyms, deren Form komplementär zum Substrat ist (geometrische Komplementarität). Des weiteren sind die Aminosäure-Reste, die die Bindungstasche bilden, so angeordnet, dass sie spezifisch mit dem Substrat wechselwirken können (elektronische Komplementarität). Die Kristallstrukturanalyse zeigte, dass die Substratspezifität der A-Domänen von acht nicht konservierten Aminosäuren bestimmt wird. Diese befinden sich zwischen den Konsensusmotiven A4 und A6. Durch Sequenzanalysen von mehr als 150 verschiedener NRPSs im Vergleich zu GrsA konnte mittels bioinformatischer Studien der „Spezifitätscode“ der A-Domänen bestimmt werden (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die Aminosäuren-Reste der A-Domänen aus TubB-TubE wurden durch ein Alignment gegen GrsA bestimmt und mit diesem Spezifitätscode verglichen, um somit die Substratspezifität der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten A-Domänen bestimmen zu können (s. Tab. 3.3.5).

Tab. 3.3.5: Die spezifitätsbestimmenden Aminosäuren aus den A-Domänen der verschiedenen Tubulysinsynthetasen (TUBs). Die Nummerierung der Aminosäuren beziehen sich auf die Gramicidinsynthetase GrsA.

Position der Aminosäure in A Domäne	235	236	239	278	299	301	322	330
Konsensus Pipecolinsäure		Y	Q	Y	C / L	G	H	L
TubB A	D	I	Q	Y	I	A	Q	V
Konsensus Isoleucin	D	G A	F	F	L F Y	G	V I	V T
TubC A1	D	A	F	F	L	G	V	T
Konsensus Valin	D	A V F	F Y W	W F M	I F L	A G	A G	T V
TubC A2	D	A	F	W	L	G	G	
Konsensus Cystein	D	L H	Y F E	N S	M L D	S I V	M L G	I
TubD A	D	L	Y	N	M	S	L	I
Konsensus Tyrosin	D	G A	T L	I G	T	A G	E	V
Konsensus Phenylalanin	D	A L	P F W	I T G		G A	G A	T V I
TubF A	A	L		W	L	A	S	F

Die ermittelten Substratspezifitäten der hintereinander liegenden A-Domänen von TubB bis TubE stimmten teilweise mit den während der Tubulysin-Biosynthese eingebauten Aminosäuren überein. Die ermittelten Substrate der A-Domänen sind Isoleucin (TubC1), Valin (TubC2) und Cystein (TubD). TubB zeigte eine Übereinstimmung im Spezifitätscode zu Pipecolinsäure. Ein solcher Spezifitätscode für Pipicolat ist bisher nur aus der Rapamycinsynthetase RapP bekannt. Die Bestimmung der Substratspezifität von TubE ergab bei dieser Analyse keine eindeutigen Hinweise auf das gewählte Substrat. Aufgrund einer postulierten Substrataffinität dieser A-Domäne zu zwei Aminosäuren (Phenylalanin und Tyrosin), war dieses Ergebnis nicht unerwartet. Ein Computerprogramm zur Bestimmung der Substratspezifität bestätigte die erzielten Ergebnisse. Die A-Domäne aus TubB wies dabei als größte Übereinstimmungen zum Spezifitätscode eine Substratspezifität für Pipecolinsäure auf (s. Abb. 21). Die mögliche Substratspezifität der A-Domäne aus TubF ließ sich mit diesem Programm ebenfalls nicht ermitteln.

<u>TubB</u>		<u>TubC1</u>	
RapP-M1-Pip (Rapamycin)		AdpD-M1-Ile (Anabaenopeptolid)	
TubB:	1 DIQYIAQV 8	TubC1:	1 DAFFLGVT 8
	D QY+ +		DAFFLGVT
RapP:	1 DYQYLGH L 8	AdpD:	1 DAFFLGVT 8
<u>TubC2</u>		<u>TubD</u>	
GrsB-M2-Val (Gramicidin)		AngR-M1-Cys (Anguibactin)	
TubC2:	1 DAFWLGGT 8	TubD:	1 DLYNMSLI 8
	DAFW+GGT		DLYNMS+I
GrsB:	1 DAFWIGGT 8	AngR:	1 DLYNMSMI 8

Abb. 21: Untersuchung der Substratspezifität der A-Domänen aus den verschiedenen TUBs. Die Bestimmung erfolgte nach Ravel *et al.* (2000). Durch Homologievergleiche der acht nicht konservierten Aminosäuren aus den A-Domänen der verschiedenen TUBs mit A-Domänen aus der Rapamycin- (RapP), der Anabaenopeptolid- (AdpD), der Gramacidin- (GrsB) und der Anguibactinsynthetase (AngR), konnten die Substratspezifitäten, außer für die A-Domäne aus TubF, ermittelt werden. Die 1-8 bezieht sich auf diese acht Aminosäuren der A-Domänen, die für die Substratspezifität in den jeweiligen NRPS-Modulen verantwortlich sind (s. dazu Tab. 3.3.5).

3.3.10.3 Analyse der Peptidyl- bzw. Acyl Carrier Protein Domänen

Die Carrier Protein Domänen bilden die kleinsten Domänen der NRPS/PKS Module. Sie werden durch die Übertragung eines Phosphopantetheinrests, der aus Coenzym A stammt, posttranslational aktiviert (Lambalot *et al.*, 1996). Der Phosphopantetheinrest wird dabei auf die Hydroxygruppe eines hochkonservierten Serins übertragen und fungiert im Anschluss als „schwingender Arm“, der das gebundene Intermediat zum nächsten Modul reicht. Auf diese prosthetische Gruppe des PCP wird die durch die A-Domäne aktivierte Aminosäure als Aminoacylrest übertragen. Analog wird ein ACP mit einer kurzkettigen Carbonsäure von der AT-Domäne beladen. Die Bindung an den Ppant „Arm“ findet an einer Sulfhydrylgruppe statt. Die aus den TUBs stammenden PCP-Domänen zeigten im Vergleich zu beschriebenen Konsensusmotiven (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998) hohe Ähnlichkeiten (s. Abb. 22).

<u>PCPs</u>				<u>ACPs</u>			
Konsensus		D x F F x x L G G H S L		Konsensus		L G F D S	
		D	I				
TubB PCP	VGVEDNFFQ-LGGHSLLA			TubD ACP	TDSFFQ G LLGIQ		
TubC PCP1	VSVH D D- LA			TubF ACP	DDDFE K G LLAIQ		
TubC PCP2	VSRE N D-V LL						
TubD PCP	VEPQ SLLD- A VAL						
TubE PCP	IAPEAS D- N LL						

Abb. 22: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten PCP und ACP-Domänen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte der Konsensusmotive (Konz & Marahiel, 1999; Tang *et al.*, 1998). Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit den Aminosäuren des jeweiligen Konsensusmotives überein. Bei sämtlichen PCP Domänen fehlt eine nicht konservierte Aminosäure (x) im Vergleich zur Konsensussequenz (blau markiert).

3.3.10.4 Analyse der N- und C-Methyltransferase Domänen

Durch Vergleiche der NRPS Aminosäuresequenzen mit Datenbankeinträgen konnte gezeigt werden, dass in den A-Domänen von TubB und TubC Proteinabschnitte mit hohen Homologien zu SAM-abhängigen Methyltransferasen integriert sind. Eine weitere Methyltransferase konnte in der PKS TubF identifiziert werden. SAM-abhängige Methyltransferasen zeigen aufgrund ihres diversen Substratspektrums und

der verschiedenen Zielatome (O-, N-, C-, S-Atome) keine ausgeprägte Homologien zueinander. Aus der Cofaktor-Bindestelle dieser Enzyme sind vier konservierte Motive bekannt (Kagan & Clarke, 1994). Durch weitere Homologievergleiche der identifizierten Domänen mit dem Programm NPBiogene ([//www.npbiogene.com](http://www.npbiogene.com)) konnte eine hohe Ähnlichkeit zu N- (für TubB und TubC) bzw. C-Methyltransferasen (TubF) bestimmt werden. Die vermuteten MT Domänen zeigten eine Übereinstimmung mit den vier bekannten Konsensusmotiven aus SAM-abhängigen Methyltransferasen (Kagan & Clarke, 1994). In Abb. 23 sind die Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen zu bekannten Methyltransferasen aus den Biosynthese-Genclustern der Sekundärmetabolite Anabaenopeptolid (Rouhiainen, 2000) und Microcystin (Nishizawa *et al.*, 2001; Tillett *et al.*, 2000) angegeben.

		Motiv I		Motiv PostI	
		L IVEV C P ILEIGGGTG		hhxhD	
Konsensus					
TubB NMT		LVP	RVLELGCGSGLLLR	CESYWGTELSPVAV
TubC NMT		LRP	RILEVCGGTGLMLF	CERYVGTFDFSPAAL
AdpB NMT		GKP	QRVLEIGCGSGLLLF	CQEWGADYSSATI
McyA NMT		---	VLEIGCGTGLILF	CQCYWGTDISSVAL
TubF CMT		GRT	LRILEVGGGSGVVLQ	PVEYHFTDIGPSFV
McyJ CMT2		NHQ	LRILEIGGGTGATTA	QIEYVFDTISSSFL
McyJ CMT1		SAS	LRILEIGAGTGATTQ	QITYTFTDVSPFFL
		Motiv II		Motiv III	
		A Y L PTY VFV GQFDAIIC		L F K IIII LLRPGGRLLL	
Konsensus					
TubB NMT		SGLPEAG T NSVT	ALRV Q T GDV
TubC NMT		SGVAA S L NSVV	CVEAVED FV VGDV
AdpB NMT		EGIPQ A T V NSVV	AMTAIASQ K VGDV
McyA NMT		EGLSEGE T NSVV	AIKV T C GDV
TubF CMT		QGHPPGSYDLVIALNVV	LESLLVPGGHLCCLVET
McyJ CMT2		QGFFP S I AANVL	VRS IA N L LES
McyJ CMT1		QGFCCHS L AANVL	IQS H LEL

Abb. 23: Sequenzvergleiche der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Methyltransferasen. Abgebildet sind die Proteinabschnitte mit den konservierten Motiven SAM-abhängiger Methyltransferasen (Kagan & Clarke, 1994). Zum Vergleich der N- (TubB und TubC) und C-Methyltransferasen (TubF) sind die Homologien zu Aminosäuresequenzen bekannter MT-Domänen aus den Enzymkomplexen zur Synthese des Anabaenopeptolid (AdpB) und Microcystin (McyA und McyJ) angegeben. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen dabei mit der Konsensussequenz überein. „h“ steht für eine hydrophobe und „x“ für eine beliebige Aminosäuren.

3.3.10.5 Analyse der Heterozyklisierungsdomäne

Anstelle von Kondensationsdomänen können in einem NRPS Modul HC-Domänen vorhanden sein. Diese Domänen katalysieren die Bildung von fünfgliedrigen Heterozyklen. Innerhalb des NRPS Moduls von TubD konnte eine solche Domäne identifiziert werden (s. Abb. 24). Vergleiche der Aminosäuresequenz zeigten große Übereinstimmungen gegenüber bekannten HC-Domänen aus anderer Enzymkomplexen, z.B. für die Synthese von Bleomycin und Myxothiazol. In der HC aus TubD konnten die bekannten Konsensusmotive Z1-Z7 identifiziert werden (Konz & Marahiel, 1999). Auffällig bei dieser Sequenzanalyse war, dass in allen Aminosäuresequenzen Abweichungen innerhalb von Motiv Z2 auftraten.

	<u>Z1</u>	<u>Z2</u>	<u>C3</u>
Konsensus	^S FPLTxxQxAYxxGR	^L ^{I A D} RHxMLPxNGxQ	^R ^N DxxxxDxxS
TubD HC	RFEP DV E WV R	LQ D RMVVLDPG	SM ALML AW S
MtaC HC	QFEPFPLTDIQETIFVGRG	IEQHVMLRSVVLPTG	DFDAITADASAV
Bleo HC	RHEP DV R YV E	IA P RAVIRPDG	GV ALIC AH F
	<u>Z3</u>	<u>Z4</u>	<u>Z5</u>
Konsensus	^{L F} ^{I A P} LPxxPxLP	^F ^A ^T TPxxxLxxxxxxxxVLxxW	^N ^{AQ} GDFT
TubD HC	LDTLPPPELPL	GLTPSAACMAFAEVLARWS	LVGDFTS
MtaC HC	LNDMPDAPALPV	GLTASGVVCAFAEVLGAWS	LLGDFTT
Bleo HC	LPELPPGPPELPL	GLSPSGVLLAAFAEVITAWS	IVGDFTS
	<u>Z6</u>	<u>Z7</u>	
Konsensus	^{I A} PVVFTSxL	^{I H} ^F ^Y QVxLDxQxxxxxxxxxxxxWD	
TubD HC	IMPVVFTSIL	QTPQVWLDHGVHEEGALVLAWS	
MtaC HC	IMPVVFTSLL	QTPQMWLDHQVREEAGALYCHWS	
Bleo HC	LT D	QTP H H VAEDRGELVFN A	

Abb. 24: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Heterozyklisierungsdomäne. Abgebildet sind die Konsensusmotive Z1-Z7 (Konz & Marahiel, 1999). Dabei werden die Übereinstimmungen der HC-Domäne aus TubD mit bereits bekannten HCs verglichen. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit der Konsensussequenz überein.

3.3.10.6 Analyse der Oxidationsdomäne

Innerhalb der NPRS TubD wurde eine Proteindomäne mit großen Ähnlichkeiten zu FMN-Bindeproteinen identifiziert. Diesen Domärentyp findet man nur in NRPS Modulen, die einen durch Heterozyklisierung entstehenden Oxazolin- bzw. Thiazolinring in seine oxidierte Form (Oxazol bzw. Thiazol) umwandeln. In den Sekundärmetaboliten Bacitracin mit einem Thiazolinring (Konz *et al.*, 1997) oder Yersiniabactin mit einem Thiazolidinring (Gehring *et al.*, 1998) findet man solche Domänen nicht. Im Melithiazol-Biosynthesegencluster beinhaltet die NRPS MelC eine Ox-Domäne, obwohl ein Thiazolinring an der korrespondierenden Stelle in das Molekül eingebaut ist. Inaktivierungsversuche und Sequenzvergleiche zum Myxothiazol Biosynthesegencluster zeigten aber eindeutig, dass diese Domäne inaktiv sein muss (Weinig *et al.*, 2003a). Dies zeigt, dass diese Domänen für die Oxidation des Heterozyklus verantwortlich sind. Shen und Mitarbeiter (Du *et al.*, 2000) identifizierten für diese Ox-Domänen zwei verschiedene Konsensusmotive. Diese Motive konnten in Sequenzvergleichen in der Ox-Domäne von TubD identifiziert werden. Die entsprechenden Proteinabschnitte sind in Abb. 25 in Übereinstimmung mit einer Ox-Domäne aus dem Bleomycin- (Du *et al.*, 2000) und Leinamycin-Biosynthesegencluster (Cheng *et al.*, 2002) abgebildet.

	<u>Ox-1</u>	<u>Ox-2</u>
Konsensus	YxSAGxxYxVQxYx	xMxQLLxxxAxxxxGxC
TubD Ox	RYL A GL P L LHL	AGL T DLGA PSG L L HIG
BleoIII Ox	KYAYPSAGSSYPVQTYLLV	AGAMTQLLMRTAVGTGIGLCPVG
LnmI Ox	GALYPSAGDTYSVQVYLHL	SGYMSQLLMLGQA AHGVGLCPIG

Abb. 25: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Oxidationsdomäne. Abgebildet sind die Proteinbereiche, in denen sich die Konsensusmotive Ox-1 und Ox-2 (Du, 2000) der Domänen befinden. Die Aminosäuresequenz aus TubD wird hierbei mit bekannten Sequenzen von Ox-Domänen aus der Bleomycin- (BleoIII) und der Leinamycin-Synthetase (LnmI) verglichen. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit der Konsensussequenz der jeweiligen Motive überein.

3.3.10.7 Analyse der β -Ketoacylsynthase Domänen

KS-Domänen katalysieren die Reaktion der decarboxylativen Verknüpfung von zwei Polyketidbausteinen. Während der Katalyse wird das Intermediat an ein hochkonserviertes Cystein gebunden (Donadio *et al.*, 1991), dass sich innerhalb eines Konsensusmotivs befindet. Die zwei KS-Domänen aus TubD und TubF zeigen im Vergleich mit anderen KS-Domänen dieses hochkonservierte Motiv (s. Abb. 26). Aus der Kristallstrukturanalyse der an der Fettsäurebiosynthese beteiligten β -Ketoacyl Synthase II aus *E. coli* ist bekannt, dass eine Reihe polarer Aminosäuren essentiell für deren katalytische Aktivität sind (Huang *et al.*, 1998). Aufgrund der ähnlichen Biochemie sind diese Aminosäuren in den KS-Domänen bakterieller PKS vom Typ I ebenfalls hochkonserviert und konnten in den KS-Domänen der Tubulysinsynthasen nachgewiesen werden.

A)			
Konsensus		DxxCSSxL	
TubD KS	GPALGIHTA	TS	VSINMACSALRGFECDMALAGGVSL
TubF KS	GPSVAVQTA	S	VAVHLACQSLLNCECALALAGGSSL
MtaB KS1	GPSLAI	TA	S VAIHEACRSLRSGESSLALAGGVQL
MxaD KS	GPCMSIDTACSSSL	VALHVACQSLRNRECDLALSAGVNL	
StiB KS	GPSIVV	TA	S VAVHLACQSLRSKECDLAIAGGANL
B)			
Konsensus	FAS KAS II	H	D E H
TubD KS	AGISARDITYVEAH	GTGTPLG	PIEVAALTRAFTADTAFTLGAVKSNIGHLDA
TubF KS	AAVSADSIGYVEA	GTATALG	PIVQALTRAFTKHTERRGYCALGSVKANIGHLDA
MtaB KS1	AGMDPAQVHYVEL	GTGTPLG	PIAGALGAVLGAAREAERPLHVGSVKTNIGLEAA
MxaD KS	GGLKPSQISFVEA	GTGTSLG	PIQLQALARVLGTGRSAETPLFVGSVKTNVGLEAT
StiB KS	GGVKPEQVSYIET	GTGTILG	PIVSALSEVYGKPRPDGRPCILGSVKTNVGLEAA

Abb. 26: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Ketoacylsynthase Domänen. A) Abgebildet ist der Proteinabschnitt, der das hochkonservierte Konsensusmotiv trägt. Die KS-Domänen der Tubulysin-Biosynthese sind hier im Sequenzvergleich zu anderen KS-Domänen aus der Myxothiazol- (MtaB), der Myxalamid- (MxaD) und der Stigmatellin-Synthase (StiB) dargestellt. Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz übereinstimmen, wurden grau unterlegt (Donadio *et al.*, 1991). B) Im unteren Bildabschnitt sind diejenigen Aminosäuren schwarz unterlegt, die übereinstimmend zu der β -Ketoacyl Synthase II (KAS II; FAS: Fatty acid synthase) aus *E. coli* hochkonserviert sind (Huang, 1998).

3.3.10.8 Analyse der Acyltransferase Domänen

Die AT-Domänen interner PKS-Module verwenden die Coenzym A-Thioester von Dicarbonsäuren (in der Regel Malonyl- oder Methylmalonyl-CoA) als Substrat, wo hingegen AT-Domänen von Lademodulen die Coenzym A-Thioester von Carbonsäuren als Substrat auswählen, mit der die Biosynthese startet. Das von Haydock *et al.* (1995) beschriebene hochkonservierte Motiv GxSxG für Acyltransferasen wurde in den beiden ATs der Tubulysinsynthesen identifiziert. Zur weiteren Klassifizierung von AT-Domänen zeigten Modelling-Studien, dass myxobakterielle AT-Domänen, die 103 Aminosäuren hinter dem GxSxG Konsensusmotiv die Aminosäureabfolge HAFH aufweisen, eine Malonyl-CoA Substratspezifität besitzen (Hecht und Kendrew; persönliche Mitteilung). Im Gegensatz dazu enthalten Methylmalonyl-CoA spezifische AT-Domänen an dieser Stelle die Aminosäurenabfolge YASH. Durch bioinformatische Studien konnte diese Hypothese der Substratspezifität von AT-Domänen bestätigt werden (Yadav *et al.*, 2003).

Die AT-Domänen aus TubD und TubF zeigen beide eine Substratspezifität für Malonyl-CoA (s. Abb. 27), was mit dem Aufbau des Tubulysin-Moleküls übereinstimmt. Die AT-Domänen wurden für diese Analysen mit bekannten Protein-Domänen aus den Multienzymkomplexen für die Synthese von Myxothiazol, Myxalamid und Stigmatellin verglichen.

A)			
Konsensus		GxSxG	
TubD AT	WGLQPQALAGHSLGELVAACLAGVFSLEDALQLVAARG		
TubF AT	WGIRPTALLGHSLGEYVAACLAGVFSLEEALVVAARG		
MtaB AT2	WGIEPDAVAGSSIGEVAAAYAAGVLTLEEAMRITVAR		
MxaD AT	WGIEPSAVVGHSMEVAAAHVAGTSLSDAAKIICRRS		
StiB AT	WGIEPSVVMGHSVGEYAAACVAGVFNLEEGRLIAARG		
B)			
TubD AT	···RRLETS HAFHS ASME···	MxaD AT	···RFVKVDV ASH SPQMD···
TubF AT	···TPLAV SHAFH SPMME···	MtaB AT2	···RRIGLD YASH SPAVE···
StiB AT	···RRLNV SHAFH SPLME···		
M-CoA	HAFH	MM-CoA	YASH

Abb. 27: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Acyltransferase Domänen. A) Aminosäuren, die mit dem hochkonservierten Motiv funktionaler AT Domänen (Haydock *et al.*, 1995) übereinstimmen, sind grau unterlegt. B) Die Aminosäuren, welche die Substratspezifität bestimmen und somit eine Unterscheidung zwischen Malonyl-CoA (M-CoA) und Methylmalonyl-CoA (MM-CoA) spezifischen AT-Domänen ermöglichen, sind im unteren Bildabschnitt zu sehen und ebenfalls grau unterlegt. Die Aminosäuresequenzen wurden mit AT-Sequenzen aus der Myxothiazol- (MtaB), der Myxalamid- (MxaD) und der Stigmatellin-Synthase (StiB) verglichen.

3.3.10.9 Analyse der β -Ketoacylreduktase Domänen

Durch die KR-Domäne kann der β -Ketoacylthioester in einer NADPH-abhängigen Reaktion zum sekundären Alkohol reduziert werden. Die NADPH-Bindestelle ist ein hochkonserviertes Motiv, dass in allen funktionellen KR-Domänen vorhanden sein muss (Tang *et al.*, 1998). In Abb. 28 ist die Sequenzanalyse der KR Domänen aus TubD und TubF im Vergleich zu bekannten KR-Domänen aus der Myxalamid-, Myxothiazol- und der Rapamycinsynthese zu sehen. In beiden Domänen konnte die hochkonservierte Aminosäurenabfolge der NADPH-Bindestelle (Wierenga *et al.*, 1983) identifiziert werden. Bei der KR aus TubF liegt die Bindestelle aber im Vergleich zu den anderen KR-Domänen 190 Aminosäuren weiter am C-Terminus der Aminosäuresequenz lokalisiert. Homologievergleiche mit dem im Internet zugänglichen Programm NPBiogene erbrachte trotz dieser ungewöhnlichen Aminosäurenabfolge auch den Hinweis, dass es sich um eine KR-Domäne handelt. Damit weist diese KR eine neue Organisation in ihrer Aminosäuresequenz auf.

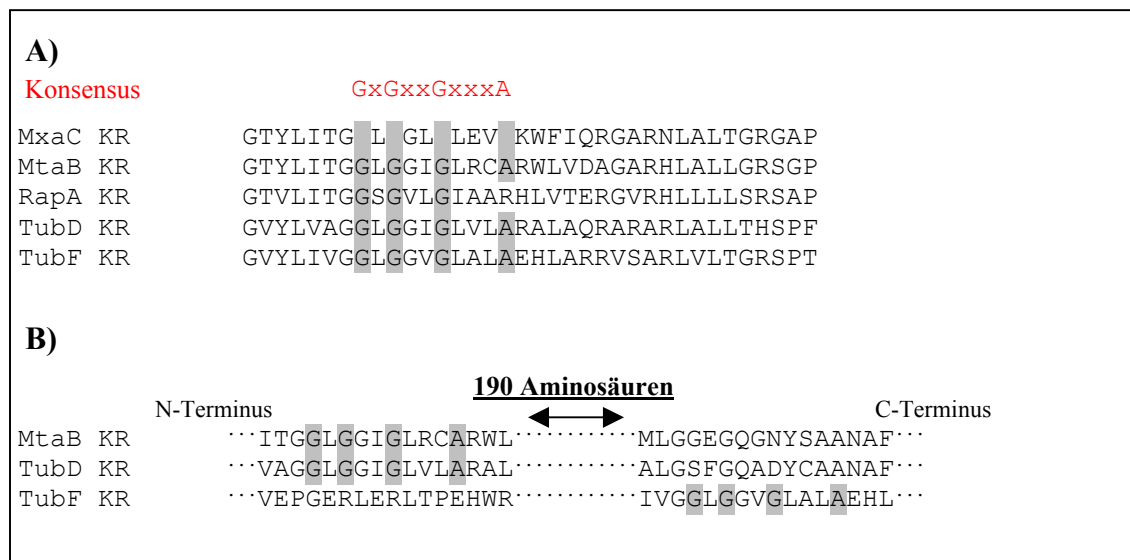


Abb. 28: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Ketoacylreduktase Domänen. A) Im oberen Abschnitt ist die Proteinsequenz der KR-Domänen aus den Tubulysinsynthesen abgebildet, in dem sich das hochkonservierte Motiv der NADPH-Bindestelle befindet. Die Aminosäuresequenzen wurden mit KR-Domänen der Rapamycin- (RapA), der Myxalamid- (MxaC) und Myxothiazol-Synthase (MtaB) verglichen. B) Der untere Bildausschnitt zeigt die unterschiedliche Aminosäurenabfolge von TubF zu anderen KR-Domänen. Die NADPH Bindestelle befindet sich bei dieser KR ca. 190 Aminosäuren weiter am C-terminalen Ende des Proteins. Die mit der Konsensussequenz übereinstimmenden Aminosäuren sind grau unterlegt.

3.3.10.10 Analyse der β -Hydroxy-Dehydratase Domäne

DH-Domänen katalysieren die Abspaltung von H_2O , wodurch aus dem Alkohol eine Enoylform entsteht. Diese Domänen wurden in beiden PKS-Modulen in TubD und TubF identifiziert. Bei der Sequenzanalyse wurden die DH-Domänen der Tubulysinsynthasen mit anderen DH-Domänen verschiedener Enzymkomplexe verglichen, die an der Synthese von Myxothiazol, Myxalamid und Stigmatellin beteiligt sind. DH-Domänen enthalten ein hochkonserviertes Motiv (Donadio & Katz, 1992), das in TubF eindeutig wiederzufinden ist (s. Abb. 29). In der DH von TubD sind nur zwei konservierte Aminosäuren dieses Motivs enthalten. Sowohl das konservierte Histidin, als auch Glycin sind in dieser Domäne durch ein Alanin bzw. Histidin ersetzt wurden. Da die Struktur an der korrespondierenden Stelle der Tubulysine ein vollständig reduziertes Acetat enthält, scheint diese Domäne trotzdem aktiv zu sein.

	Konsensus	LxxHxxxGxxxxP
TubD DH	LAERIQPE	LRAACEHEQPV
TubF DH	WQAERCWW	DE RLE RATL
MtaB DH	LSVEKMPFL	REHLLHGALVVAGAAHVALALSALRELRG
MxaD DH	LFADSPSY	GD VVH EVVL
StiG DH	LDPEAQPF	FE RIK AALL

Abb. 29: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten β -Hydroxy-Dehydratase Domänen. Abgebildet ist das Konsensusmotiv dieser Domänen (Donadio & Katz, 1992). Die DH-Domänen der Tubulysinsynthasen wurden mit bekannten DH-Domänen der Myxothiazol- (MtaB), der Myxalamid- (MxaD) und der Stigmatellin-Synthase (StiG) verglichen. Die grau unterlegten Aminosäuren stimmen mit der Konsensussequenz überein.

3.3.10.11 Analyse der Enoylreduktase Domänen

ER-Domänen katalysieren in einer NADPH-abhängigen Reaktion die Reduktion von Enoylen (Alkenen) zu den entsprechenden Alkanen. Sie sind daher für den letzten Schritt der vollständigen Reduktion des Carbonsäurethioesters verantwortlich. Ebenso wie die erste Reduktion des Ketoacylthioesters zum sekundären Alkohol (s. 3.3.10.9), ist diese Reaktion NADPH-abhängig, wodurch eine hochkonservierte NADPH-Bindestelle in ER Domänen vorhanden sein muss (Tang *et al.*, 1998). Dieses Konsensusmotiv konnte in den ER Domänen von TubD und TubF identifiziert werden. In Abb. 30 ist die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen dieser Domänen zu

bereits bekannten ER aus der Epothilon-, Rapamycin- und Stigmatellin-Synthase zu sehen. In der ER aus TubD erkennt man den konservierten Austausch des Valins gegen Leucin und in TubF den Austausch des Glycins gegen Threonin. Diese Austausche dürften aufgrund der bekannten Tubulysin-Struktur keine Auswirkungen auf die Aktivität der Domänen haben.

Konsensus		LxHxxxGGVG	
TubD ER	ALHTVGRLRRGERI	I AAA L	LAAVQLASR
TubF ER	ALEELARLRAGEHVL	I HAAATGVGLAGVKLALR	
EpoA ER	ALDRIARLQPGERV	I AAT	LAAVQWAQH
RapB ER	GLVDLAGLSAGESV	I AAA	MAATQIARH
StiF ER	GLQQLGRMAAGSRV	I AAA	MAAVQLAKR

Abb. 30: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Enoylreduktase Domänen. Die Aminosäuren, die mit der Konsensussequenz für funktionelle ER Domänen übereinstimmen (Tang *et al.*, 1998), sind grau unterlegt. Abgebildet sind die ER-Domänen aus TubD und F im Vergleich zu der Epothilon- (EpoA), der Rapamycin- (RapB) und Stigmatellin-Synthase (StiF).

3.3.10.12 Analyse der Thioesterase Domäne

Nach dem letzten von einer PKS oder NRPS katalysierten Verlängerungsschritt des wachsenden Intermediats wird das fertige Produkt vom Multienzymkomplex abgespalten. Die Abspaltung kann dabei durch eine Hydrolyse oder Zyklisierung des Produktes vollzogen werden. Verantwortlich dafür ist eine Thioesterase Domäne, die in der Regel im C-terminalen Bereich des letzten Moduls lokalisiert ist. Sequenzvergleiche zeigten, dass die für diese Domänen bekannte Konsensussequenz (Konz & Marahiel, 1999) in einem Proteinabschnitt am C-Terminus von TubF vorhanden ist. Die Sequenzanalyse wurde im Vergleich zu TE-Domänen der Barbamid- (Chang *et al.*, 2002) und der Syringomycin-Synthetase (Guenzi E, 1998) durchgeführt.

Konsensus		Y GHSxG	
TubF TE	LQPRGPYRLGWS	F GCVVAYEVALQL	
BarG TE	VQPQGPYLLMGWS	F GGMVALQMAHDL	
SyrE TE	VQPKGYPYRIGWS	A GGLIAYEMARQL	

Abb. 31: Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten Thioesterase Domäne. Dargestellt ist der Proteinbereich der TE Domänen, der das Konsensusmotiv trägt (Konz & Marahiel, 1999). Die Sequenzanalyse wurde im Vergleich zu den TE-Domänen aus der Barbamid (BarG) und Syringomycin-Synthetase (SyrE) durchgeführt. Grau hervorgehoben sind die Aminosäuren, die mit dem Motiv übereinstimmen.

3.4 Gezielte Inaktivierung von Genen aus dem Tubulysin-Biosynthesegencluster durch homologe Rekombination

3.4.1 Inaktivierung von *tubZ*

Das Gen *tubZ* kodiert für ein Protein mit Homologien zu Lysin-Cyclodeaminasen. Für dieses Enzym wird analog zur Rapamycin-Biosynthese (Molnar *et al.*, 1996) postuliert, dass es die Reaktion zur Bildung von Pipecolinsäure, ausgehend von der Aminosäure Lysin, katalysiert. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden Versuche zur spezifischen Inaktivierung von *tubZ* durchgeführt. Die *tubZ*-Insertionsmutanten sollten durch den Ausfall der Startereinheit kein Tubulysin mehr produzieren können, was durch einen Cytotoxizitätstest aufgezeigt werden sollte. Durch eine zusätzliche Fütterung von Pipecolinsäure zu den entsprechenden Mutanten-Kulturen sollte dieser Defekt nachträglich komplementiert werden. Des weiteren könnte der Zusatz von Pipecolinsäure-Analoga (Prolin, 4-Hydroxy-Prolin) zu den Kulturen dieser Insertionsmutanten zur Produktion von Tubulysin-Derivaten führen, die durch eine HPLC-MS Analyse nachweisbar wären.

3.4.1.1 Erzeugung der *tubZ*-Mutante

Zur Inaktivierung von *tubZ* wurden die zwei verschiedenen Mutageneseplasmide pTubZ-A und pTubZ-B verwendet (s. Tab. 2.3.2). Da das Gen *tubZ* 1.101 bp groß ist, konnte für eine Insertionsmutagenese mit den Primern TubZ_{up/down} nur ein 570 bp großes Fragment aus dem mittleren Bereich des Gens amplifiziert und kloniert werden (pTubZ-A). Um einen größeren Bereich für die homologe Rekombination einsetzen zu können, wurde mit den Primern TubZ_{up}/Orf1_{down} ein 1629 bp großes Fragment amplifiziert, das vom mittleren Genabschnitt aus *tubZ* bis in den Leserahmen von *orf1* reicht (pTubZ-B). Dieses Fragment könnte in *A. disciformis* An d48 zur Inaktivierung von *tubZ* führen, falls dieses zusammen mit den Genen *orf1* und *orf2* als Operon transkribiert wird und keinen eigenen Promotor hat (s. Diskussion 4.5).

A. disciformis An d48 wurde wie unter 2.5.15.1 beschrieben transformiert. Bei diesen Transformationsansätzen konnten nur Mutanten durch den Einsatz des Mutageneseplasmids pTubZ-B generiert werden. Die chromosomale DNA der resultierenden kanamycinresistenten Klone wurde isoliert und genotypisch analysiert (s. 2.5.1 und 2.5.14). Durch eine Analyse nach Southern wurde die ortsspezifische Integration von pTubZ-B in das Genom der Mutante TZAS1 nachgewiesen (s. Abb. 32).

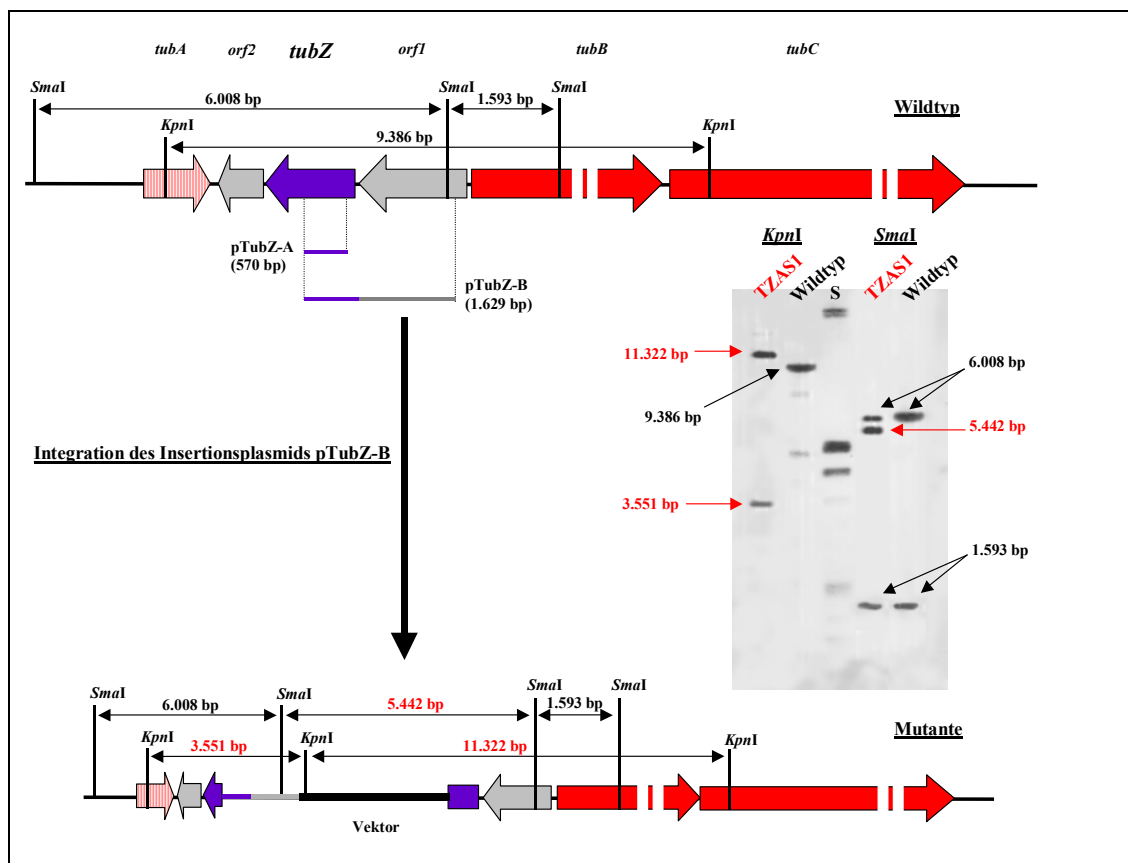


Abb. 32: Southern-Blot Analyse zur ortsspezifischen Integration von pTubZ-B. Abgebildet ist die Genabfolge von *tubA* bis *tubC* im Vergleich zwischen Wildtyp (oben) und der Mutante TZAS1 (unten). Die farbliche Unterscheidung der einzelnen Gene wurde analog zur Abb. 16 (S. 93) eingehalten. Im Southern-Blot sind die resultierenden Veränderungen der Fragmentgrößen nach der Integration des Insertionsplasmids pTubZ-B zwischen der chromosomalen DNA des Wildtyps und TZAS1 zu sehen. Der schwarze Balken (fett gedruckt) stellt den Vektorenanteil des Insertionsplasmids dar. Das DNA-Insert des Insertionsplasmids ist als lila/grauer Balken dargestellt. Die farbliche Unterteilung deutet die homologen Sequenzbereiche aus *tubZ* und *orf1* an. Die DNA wurde vor der Analyse nach Southern mit den Restriktionsenzymen *KpnI* sowie *SmaI* hydrolysiert. Als Sonde wurde das markierte Insert aus pTubZ-B eingesetzt. Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte mit dem DIG-markierten Größenstandard III (S) der Fa. Roche Diagnostics.

Die eingesetzten Extrakte der Mutante TZAS1 zeigten in einem Cytotoxizitätstest weiterhin eine spezifische Tubulysinwirkung auf eukaryontische L929 Zellen. Eine HPLC-MS Analyse zeigte, dass in diesen Extrakten die gleiche Konzentration an Tubulysin D (Masse 427) wie im Wildtypen *A. disciformis* An d48 (0,7 mg/l) enthalten war.

3.4.2 Inaktivierung von *orf2*

Dem Gen *orf2* konnte über Vergleiche der abgeleiteten Aminosäuresequenz keine Funktion zugeordnet werden. Da dieser Leserahmen innerhalb des Tubulysin-Genclusters liegt, sollte eine mögliche Funktion in der Biosynthese durch eine Insertionsinaktivierung überprüft werden.

3.4.2.1 Generierung der *orf2*-Mutante

Für diesen Versuch wurden die Mutageneseplasmide pOrf2-A und pOrf2-B verwendet. Die Fragmente wurden nach einer PCR-Amplifikation mit den Primerpaaren Orf2_{up/down} bzw. Orf2_{up}/TubZ_{down} in den pCR[®] 2.1-TOPO Vektor kloniert und haben eine Größe von 554 und 1204 bp. Da das Gen *orf2* nur 660 bp groß ist, wurden beide Inaktivierungsfragmente so gewählt, dass sie in ihrer Nucleotidsequenz homolog zum vorderen Sequenzabschnitt von *orf2* sind und zusätzlich einen Sequenzabschnitt von *tubZ* abdecken. Eine Inaktivierung dieses Gens ist unter Verwendung dieser Mutageneseplasmide nur möglich, falls *orf2* in einem Operon mit *tubZ* (und *orf1*) vorliegt und keinen eigenen Promotor besitzt (s. Diskussion 4.5).

A. disciformis An d48 wurde mit pOrf1-A und pOrf2-B transformiert (s. 2.5.15.1). Wiederum konnten nur Mutanten mit dem größeren Inaktivierungs-Fragment porf2-B generiert werden. Nach Isolierung der chromosomalen DNA dieser Transformanten wurde eine ortsspezifische Integration des Mutageneseplasmids nachgewiesen. Die Mutanten O2BAS3 und O2BAS4 zeigten das erwartete Hybridisierungsmuster (s. Abb. 33).

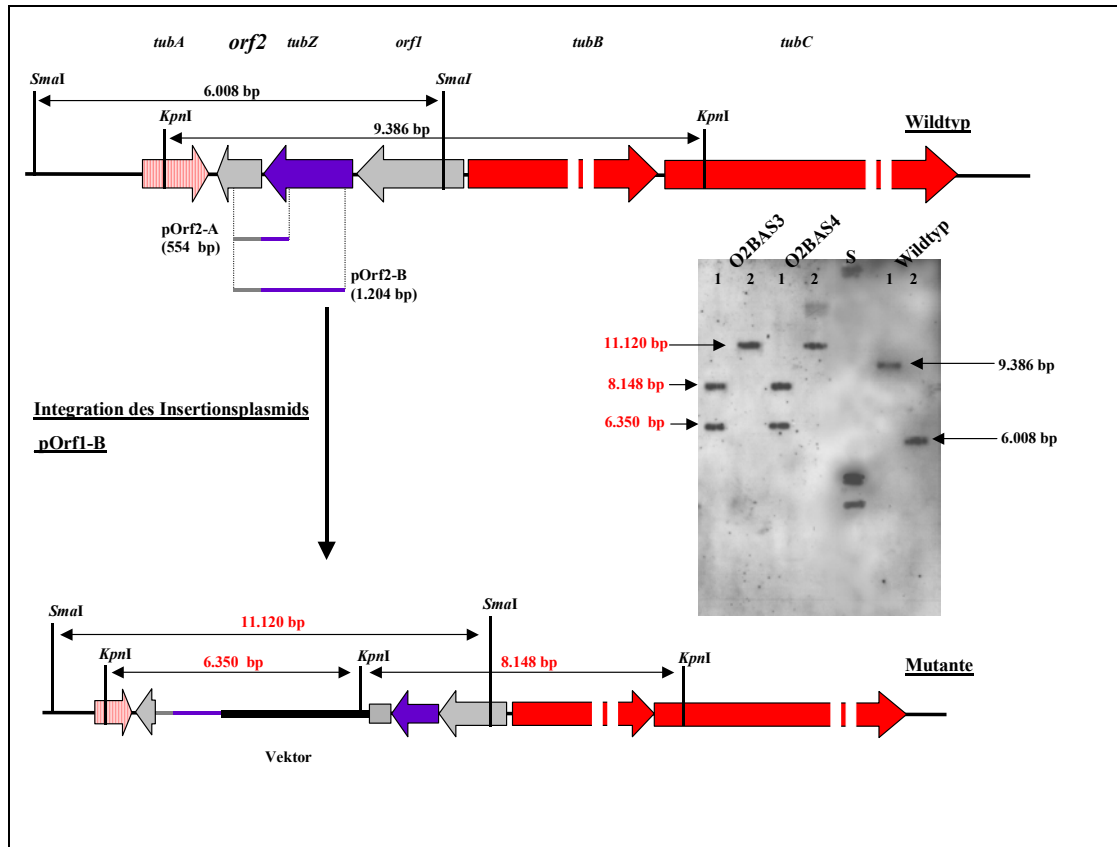


Abb. 33: Southern-Blot Analyse zur ortsspezifischen Integration von pOrf2-B. Abgebildet ist die Genabfolge von *tubA* bis *tubC* im Vergleich zwischen Wildtyp (oben) und den Mutanten O2AS3 und 4 (unten). Die farbliche Unterscheidung der einzelnen Gene wurde analog zur Abb. 16 (S. 93) eingehalten. Der schwarze Balken (fett gedruckt) stellt den Vektorenanteil des Insertionsplasmids dar. Im Southern-Blot sind die resultierenden Veränderungen der Fragmentgrößen nach der Integration des Insertionsplasmids pOrf2-B zwischen der chromosomalen DNA des Wildtyps und den beiden Mutanten zu sehen. Das DNA-Insert des Insertionsplasmids ist als lila/grauer Balken dargestellt. Die farbliche Unterteilung deutet die homologen Sequenzbereiche aus *orf2* und *tubZ* an. Die DNA wurde vor der Analyse nach Southern mit den Restriktionsenzymen 1) *Kpn*I und 2) *Sma*I hydrolysiert. Als Sonde wurde das markierte Insert aus pOrf2-B eingesetzt. Die Abschätzung der Fragmentgrößen erfolgte mit dem DIG-markierten Größenstandard III (S) der Fa. Roche Diagnostics.

In einem Cytotoxizitätstest konnte in den Extrakten der beiden Mutanten O2BAS3 und O2BAS4 eindeutig eine Tubulysin-spezifische Wirkung, wie im Wildtypen *A. disciformis* An d48, nachgewiesen werden. Durch eine HPLC-MS Messung wurde gezeigt, dass in den Kulturextrakten dieser Mutanten 0,6 bzw. 0,9 mg/l Tubulysin enthalten war.

3.4.3 Inaktivierung von *tubG*

Um zu untersuchen, ob die von *tubG* codierte Acyltransferase eine Funktion in der Tubulysin-Biosynthese hat, sollte dieses Gen durch eine homologe Rekombination inaktiviert werden. Falls die Acyltransferase in der Modifizierung des Tubulysins involviert wäre, wird erwartet, dass die cytotoxische Wirkung des gebildeten Tubulysin-Derivats durch den Verlust einer oder beider Acylreste drastisch verringert ist. Die abnehmende cytotoxische Wirkung durch den Verlust beider Acylgruppen ist in Versuchen zur Partialsynthese des Tubulysins gezeigt worden (Prof. Höfle; pers. Mitteilung).

3.4.3.1 Erzeugung der *tubG*-Mutante

Für die Insertionsinaktivierung von *tubG* (759 bp groß) wurde das Mutageneseplasmid pAT verwendet. Dieses Plasmid enthält ein 567 bp großes Fragment, das durch eine PCR mit dem Primerpaar AT_{up/down} amplifiziert und anschließend in den pCR[®] 2.1-TOPO Vektor kloniert wurde. Die Elektrotransformation von *A. disciformis* An d48 wurde wie unter 2.5.15.1 beschrieben durchgeführt. Die chromosomale DNA der generierten Mutanten wurde isoliert und durch Southern Blot Analyse die gewünschte Integration des Mutageneseplasmids im Genom nachgewiesen.

Die Nucleotidsequenz des Inserts aus pAT beginnt mit der sechsten Base von *tubG* (vom 5'-Ende). Zur Minimierung des Risikos, dass nach der homologen Rekombination eine funktionsfähige Genkopie entsteht, enthält die Oligonucleotidsequenz von AT_{up} eine zusätzliche Base (s. Abb. 34). Das Einkreuzen dieses Fragments führt zur Inaktivierung der ersten Genkopie durch eine 3'-Deletion. In der zweiten Genkopie würde es neben einer Deletion der ersten beiden Aminosäuren durch die Nucleotid-Insertion zur Verschiebung des Leserahmens kommen. Durch den neu generierten Triplet-Code entsteht nach 132 bp ein Stopcodon und die Transkription bricht an dieser Stelle ab. Bei einer derartigen homologen Rekombination von pAT ins Genom müssten daher beide Genkopien inaktiv sein.

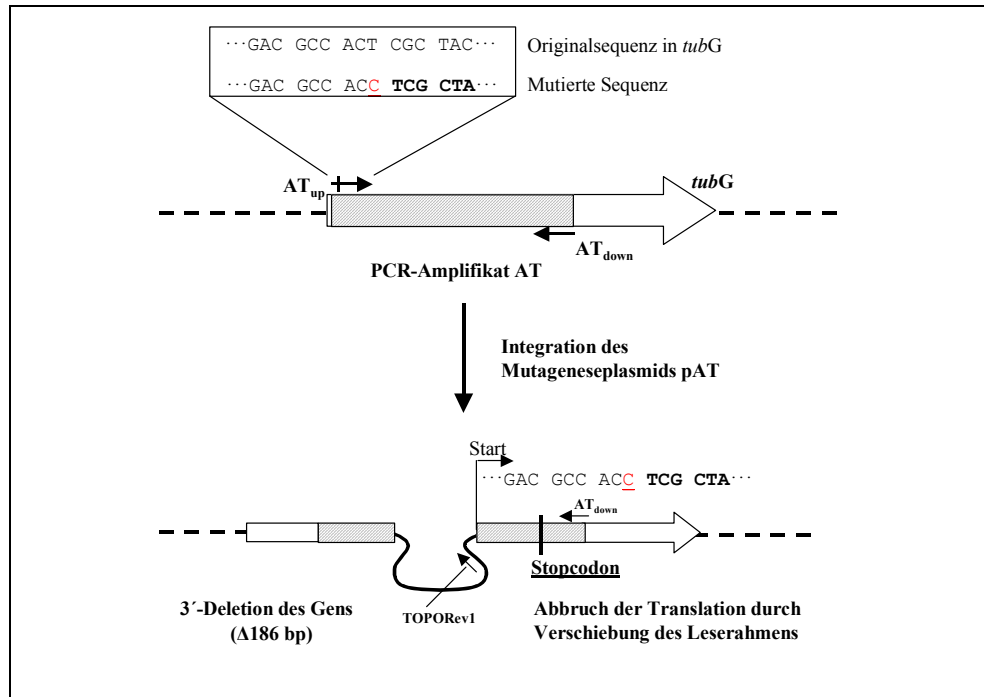


Abb. 34: Strategie zur Insertionsinaktivierung von *tubG*. Das zusätzliche Nucleotid im Primer AT_{up} ist rot dargestellt und das für die Rekombination eingesetzte Insert aus pAT grau gestreift. Nach der Transformation von pAT in die Bakterienzelle kommt es durch die Integration des Mutageneseplasmids zur Inaktivierung beider Genkopien (allgemeines Schema s. Abb. 13). Die erste Genkopie ist am 3'-Ende Δ186 bp deletiert und in der zweiten Genkopie entsteht durch die Verschiebung des Leserahmens ein internes Stopcodon. Zusätzlich fehlen in der zweiten Genkopie die ersten beiden Aminosäuren. Die Nucleotidabfolgen zeigen die DNA-Sequenz von *tubG* im Bereich der Nucleotid-Insertion an.

Der Nachweis, dass die Rekombination in der Mutante TGAS13 zur Inaktivierung der Acyltransferase geführt hat, sollte nach einer Sequenzierung des entsprechenden Sequenzabschnitts in der Mutante erfolgen. Dieser wurde in einer PCR mit dem Primerpaar TOPORev1 und AT_{down} amplifiziert und sequenziert. Die Lage der Oligonucleotide ist in Abb. 34 dargestellt. Die Sequenzanalyse zeigte eindeutig, dass die Integration des Mutageneseplasmids pAT in das Genom hinter der Nucleotid-Insertion stattgefunden hat (s. Abb 35). In der Mutante TGAS13 müssen somit beide Genkopien der Acyltransferase inaktiv sein.

In einem Cytotoxizitätstest zeigten die eingesetzten Extrakte trotzdem nahezu die gleiche cytotoxische Wirkung wie der Wildtyp von *A. disciformis* An d48. Über HPLC-MS Messungen wurde gezeigt, dass die Mutante TGAS13 ähnlich viel Tubulysin produziert (0,6 mg/l) wie der Wildstamm.

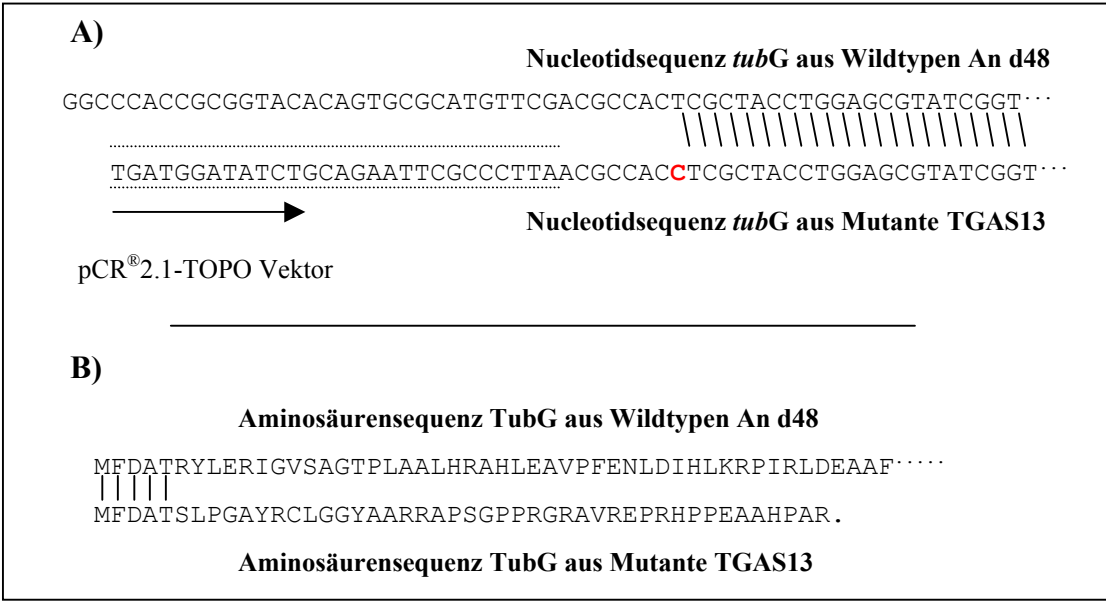


Abb. 35: Sequenzanalyse von tubG im Vergleich zwischen Wildtypen und der Mutante TGAS13. Die Sequenzanalyse zeigt in diesem Alignment A) die Insertion des zusätzlichen Cytosins (rot) im Genom der Mutante TGAS13. B) Die Verschiebung des Leserahmens führt zu einem verfrühten Stopcodon innerhalb des Triplet-Taktes und somit zum Abbruch der Translation dieser Genkopie (zu näheren Erläuterungen siehe 3.4.3.1).

3.5 Versuche zur Optimierung der Elektrotransformation von *A. disciformis* An d48

Aufgrund der geringen Transformationseffizienz von *A. disciformis* An d48 bei den bisherigen Elektroporationen, sollten verbesserte Ausgangsbedingungen bestimmt werden. Für die Optimierung der Transformationseffizienz wurden daher verschiedene Parameter variiert:

1. Verbesserung der Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten DNA
 - 1.1. Versuch zur Erhöhung der Transformationseffizienz durch Verlängerung des DNA-Abschnitts, in dem eine homologe Rekombination stattfinden kann. Die eingesetzten Mutageneseplasmide enthielten homologe Fragmente von 554-1629 bp.
 - 1.2. Für die Elektrotransformationen wurden Mutageneseplasmide eingesetzt, die aus *E. coli* TOP10, wie auch aus *E. coli* GM2163 (*dam*⁻ und *dcm*⁻) isoliert wurden. Es

sollte untersucht werden, ob das Methylierungsmuster der eingesetzten DNA einen Einfluß auf die Transformationseffizienz hat.

- 1.3. Erhöhung der Transformationseffizienz durch den Einsatz von einzelsträngiger DNA. Die Mutagenesepasmide wurden vor der Elektrotransformation für 10 min. bei 95°C denaturiert.
2. Verbesserung der Transformationseffizienz in Abhängigkeit von der eingesetzten Bakterienkultur.

Für diese Elektrotransformationen wurden Bakterienkulturen eingesetzt, die mit unterschiedlichen Zelldichten angeimpft wurden und sich zum Zeitpunkt der Transformation in verschiedenen Wachstumsphasen befanden. Für diese Versuchsreihe wurden Mutagenesepasmide mit unterschiedlichen Insertgrößen von 554-1.629 bp eingesetzt

3. Verbesserung der Transformationseffizienz in Abhängigkeit von den eingesetzten Elektroporationsbedingungen.

In dieser Versuchsreihe wurden wiederum Mutagenesepasmide mit Insertgrößen von 554-1.629 bp eingesetzt. Zum Transfer dieser Plasmide in die Bakterienzellen wurde die Spannung pro Elektroporationsansatz von 0,4-1,4 kV in 0,1 kV-Schritten variiert.

Durch keine der genannten Veränderungen konnte eine signifikante Verbesserung der Elektrotransformation von *A. disciformis* An d48 erzielt werden.

3.6 Identifizierung und Charakterisierung von Struktur- und Regulationsgenen, deren Genprodukte an der Bildung von Sekundärmetaboliten in *A. disciformis* An d48 beteiligt sind

Alle Klone der von *A. disciformis* An d48 erzeugten Transposon-Mutantenbank wurden mittels HPLC-Analytik auf Veränderungen ihres Metabolitenspektrums im Vergleich zum Wildtypen untersucht. Durch diese Analyse sollten nicht produzierende Mutanten der Sekundärmetabolite Angiolam und Myxothiazol, wie auch Regulationsmutanten mit veränderten Stoffproduktionen identifiziert werden. Bei der Demaskierung von Nicht-Produzenten könnte die Insertion des *Himar1*-Elements sowohl in Struktur- als auch in

Regulationsgenen stattfinden. Die Identifizierung und Charakterisierung der Gene, bei denen die jeweilige Transposition den auffälligen Mutanten-Phänotypen verursacht, sollte über „Transposon-recovery“ erfolgen. Die die Insertionsstelle des *Himar1*-Elements *magellan4* flankierenden genomischen Sequenzen sollten mittels Primer-walking analysiert werden. Durch diese Methodik wird die gesamte Sequenz der betroffenen Gene erhalten und somit ihre Charakterisierung ermöglicht.

3.6.1 HPLC-Analyse der Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48

Die Extrakte der 1200 Transposon-Mutanten wurden in der HPLC-Analyse (s. 2.5.22.1) auf ein auffälliges Metabolitenspektrum gegenüber dem Wildtypen *A. disciformis* An d48 hin untersucht. In diesem „Screen“ konnten insgesamt 39 Mutanten detektiert werden, die ein verändertes Spektrum aufwiesen. Die Schwierigkeit bei dieser Analyse lag in der geringen Konzentration der produzierten Sekundärmetabolite von *A. disciformis* An d48. Es war nicht möglich, mittels DAD-gekoppelter HPLC-Analyse die UV-Spektren der gebildeten Sekundärstoffe zu ermitteln. Somit war die Auswahl spezifischer Mutanten nur durch eine individuelle Auswertung der erhaltenen Retentionszeiten in den einzelnen HPLC-Chromatogrammen möglich und führte zu einer hohen Anzahl von „falsch charakterisierten“ Mutanten. Die in diesem ersten Screen auffälligen Klone wurden aus der Dauerkultur reanimiert und wie unter 2.5.22.1 beschrieben mittels HPLC überprüft. Nach der erneuten HPLC-Analyse von Extrakten aus 50 ml Kulturen konnte für 9 Mutanten wiederum ein verändertes Metabolitenspektrum nachgewiesen werden. In Abb. 36 sind die verschiedenen HPLC-Diagramme der untersuchten Mutanten im Vergleich zum Wildtypen zu sehen. Bei dieser Untersuchung konnten jeweils 2 Mutanten identifiziert werden, die kein Angiolam (Mut550 und 813) bzw. Myxothiazol (Mut716 und 800) produzieren. Des Weiteren konnten 5 Mutanten detektiert werden, die im Verhältnis zum Wildtypen ein Vielfaches an Myxothiazol produzieren. Diese mutmaßlichen Überproduzenten waren die Mutanten Mut286, 348, 399, 422 und 649.

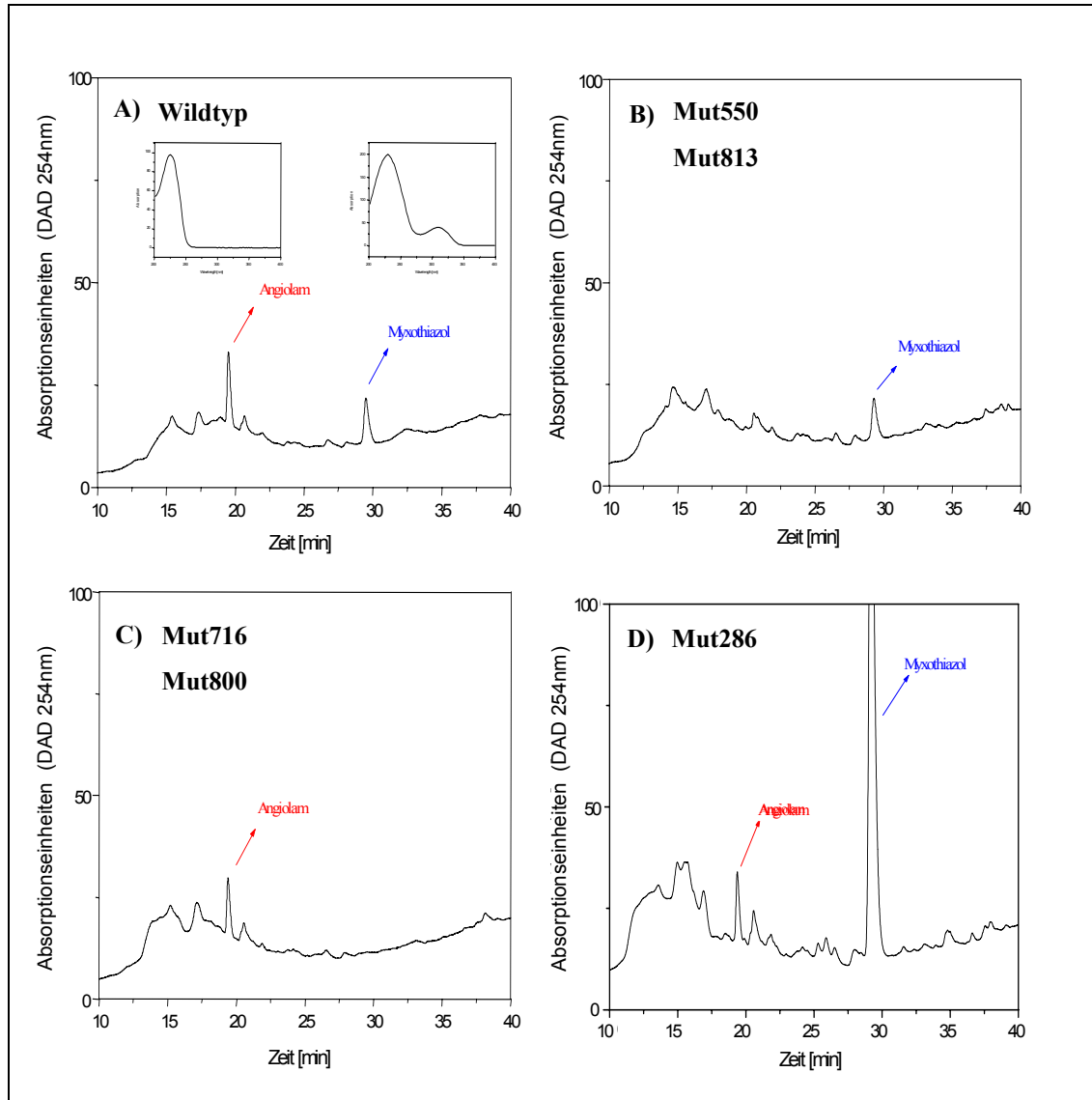


Abb. 36: Beispiele für HPLC-Chromatogramme von Extrakten aus Klonen der Transposon-Mutantenbank von *A. disciformis* An d48 mit auffälligen Metabolitenspektren. Abgebildet sind die HPLC-Chromatogramme von Extrakten des *A. disciformis* An d48 Wildtypen (A), sowie von Knockout-Mutanten des Angiolams (B) und des Myxothiazols (C). In (D) ist das Chromatogramm einer Myxothiazol-Überproduzente zu sehen. Ähnliche Chromatogramme wie D zeigten die Mutanten Mut348, 399, 422 und 649.

3.6.2 „Transposon-recovery“ und Sequenzanalyse der Mutanten

Um Informationen zu erhalten, in welchen Bereich des Genoms das *Himar1* Element in den jeweiligen Mutanten inseriert ist, wurde ein „Transposon-recovery“ durchgeführt (s. 2.5.17). Nach den Ausklonierungen mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen

(*Bam*HI und *Not*I) wurden die Inserts der resultierenden Plasmide teilweise sequenziert. Ausgehend von der bekannten Sequenz des Transposons wurden dafür die Oligonucleotide K-388, K-389 und K-390 (s. Tab. 2.3.5) eingesetzt. Die erhaltenen Sequenzen wurden auf Homologien zu anderen Genen hin mit dem Programm BLASTX untersucht. Die Suche wurde dabei gegen bekannte Genbanken-Einträge durchgeführt. In der Tab. 3.6.1 sind die erzielten Ergebnisse aufgeführt. Bei den detektierten Myxothiazol Knockout-Mutanten Mut716 und Mut800 hat eine Insertion des *Himar*1-Elements in den Strukturgenen des Biosynthesegenclusters statt gefunden. Die flankierende Genomsequenz zum *Himar*1 in Mut716 weist 89% Identität zu *mtaC* auf. Dieses Gen kodiert eine NRPS des Myxathiazol-Multienzymkomplexes (Weinig *et al.*, 2003a; Silakowski *et al.*, 1999). Die Insertionsstelle in Mut800 ist dagegen zu 90% identisch mit Sequenzanteilen aus dem Strukturgen *mtaF*, das eine PKS kodiert. Im Gegensatz dazu wurde in den beiden Mutanten Mut550 und Mut813, die kein Angiolam mehr produzieren, wahrscheinlich kein Strukturgen des Biosynthesegenclusters „getroffen“. Die Sequenzvergleiche der ausklonierten DNA-Sequenzen ergaben für beide Mutanten Homologien zu hypothetischen Proteinen. Das es sich bei allen Mutanten um nicht produzierende Mutanten des jeweiligen Naturstoffes handelt, wurde mittels HPLC-MS Analysen eindeutig nachgewiesen (H. Steinmetz; pers. Mitteilung). Von den 5 Myxothiazol Überproduzenten zeigte die ausklonierte DNA-Sequenz der Mutante Mut348 eine hohe Ähnlichkeit zu einem Gen, das eine Sensor Kinase kodiert. Die betroffenen Gene in den anderen vier Mutanten zeigten keine Homologien zu bekannten regulatorischen Elementen oder Strukturgenen anderer Biosynthesegencluster in Bakterien.

Tab. 3.6.1: Sequenzanalysen der verschiedenen Insertionsbereiche in den Transposon-Mutanten. Die erhaltenen Sequenzinformationen der Inserts aus den verschiedenen Plasmiden wurden auf Ähnlichkeiten zu anderen Genen gegen bestehende Genbanken untersucht. Die Identitäten [I] und Ähnlichkeiten [Ä] zu den gefundenen Genen sind in dieser Tabelle in Prozent angegeben. Weitere Erläuterungen stehen im oberen Abschnitt.

Mutante	Phänotyp	Homologien zu [Organismus]	Genbankeintrag	I [in %]	Ä [in %]
Mut286	Myxothiazol-Überproduzente	Chitinase D precursor [<i>B. circulans</i>]	A41961	64	74
Mut348	Myxothiazol-Überproduzente	Sensor Histidin Kinase [<i>Pirellula sp</i>]	NP_864009	62	87
Mut399	Myxothiazol-Überproduzente	Hypothetisches Protein [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	NP_625667	37	41
Mut422	Myxothiazol-Überproduzente	Hypothetisches Protein [<i>Streptomyces coelicolor</i>]	NP_419365	37	46
Mut649	Myxothiazol-Überproduzente	Phosphoglyceromutase [<i>Clostridium crescentus</i>]	ZP_00060550	27	43
Mut716	Myxothiazol-Knockout	<i>MtaC</i> [<i>S. aurantiaca</i>]	AF19811	89	91
Mut800	Myxothiazol-Knockout	<i>MtaF</i> [<i>S. aurantiaca</i>]	AF19814	90	93
Mut550	Angiolam-Knockout	Hypothetisches Protein [<i>Gloeobacter violaceus</i>]	C83268	53	64
Mut813	Angiolam-Knockout	Hypothetisches Protein [<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>]	ZP_00012455	25	36

3.6.3 Kinetiken der Myxothiazol Produktion in den verschiedenen Überproduzenten

Die Myxothiazol-Produktion in den jeweiligen Überproduzenten wurde in verschiedenen Zeitkinetiken mittels DAD gekoppelter HPLC-Analyse bestimmt. Dafür wurden 50 ml Kulturen der Mutanten mit $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft und für 5, 9 und 12 Tage inkubiert. Die Kulturextrakte wurden nach der jeweiligen Inkubationszeit chromatographisch aufgetrennt und die gebildete Myxothiazol Menge gegen eine genau definierte Menge Myxothiazol A-Standard berechnet. Für jeden Zeitwert wurde ein Mittelwert aus drei parallelen Kulturen bestimmt und die Myxothiazol-Produktion der Überproduzenten wurde mit der des Wildtypen von *A. disciformis* An d48 verglichen (s. Abb. 35). Aus den berechneten Werten dieser Kinetik sieht man, dass die absolute Myxothiazol-Menge vom fünften bis zum 9 Tag zunimmt und bis zum zwölften Tag wieder abfällt. Alle Mutanten bilden im Vergleich zum Wildtypen von *A. disciformis* An d48 ein Vielfaches an Myxothiazol. Beim Vergleich der Produktionsmaxima am

neunten Tag, bilden die Mutanten Mut286 (0,9 mg/l), Mut399 (1,2 mg/l) und Mut649 (1,1 mg/l) 9-12 mal mehr Myxothiazol. Die Mutante Mut422 (2,7 mg/l) produziert das 27 fache gegenüber dem Wildtypen und Mut348 bildet mit 3,0 mg/l das meiste Myxothiazol. Bei dieser Mutante kommt es zu einer Erhöhung der Myxothiazol-Produktion um den Faktor 30.

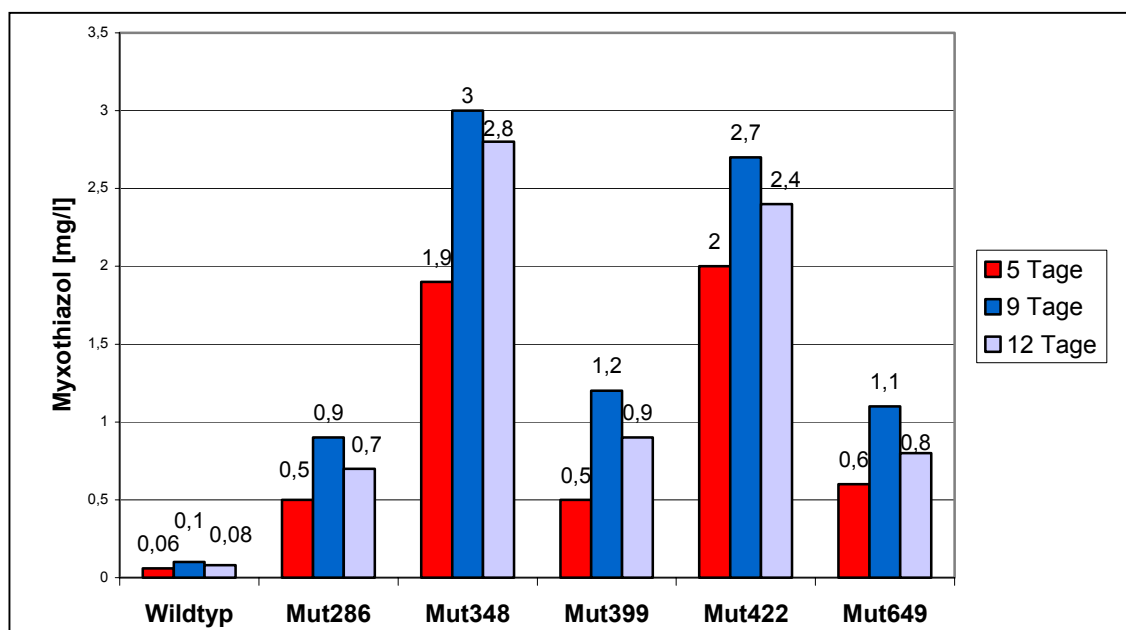


Abb. 37: Zeitkinetik der Myxothiazol-Produktion in den Überproduzenten verglichen mit dem Wildtypen von *A. disciformis* An d48.

Die Myxothiazol-Produktion der Mutanten Mut348 und Mut422 sollten in einer folgenden Feinkinetik gegenüber dem Wildtypen von *A. disciformis* An d48 nochmals untersucht werden. Zusätzlich zum Wildtypen wurde eine weitere Mutante untersucht (Mut133), die im Metabolitenspektrum und in der gemessenen Myxothiazol-Bildung dem Wildtyp ähnlich war. Die Wahl einer Vergleichsmutante als Wildtyp-Kontrolle sollte einen eventuellen Wachstums- und Produktionsnachteil der Mutanten durch das Selektions-Antibiotikum aufzeigen. Bei diesem Versuch wurde die Myxothiazol-Konzentration nach 2, 3, 5, 6, 7 und 10 Tagen bestimmt, um eine bessere Annäherung an die maximal produzierte Menge in den jeweiligen Mutanten zu erreichen. Die erhaltenen Extrakte wurden wiederum mittels DAD gekoppelter HPLC untersucht und das produzierte Myxothiazol je Kultur gegen einen Myxothiazol A-Standard bestimmt.

Das Ergebnis dieser Kinetik ist in Abb. 38 zu sehen. Die Myxothiazol-Produktion lässt sich dabei in einem sigmoiden Kurvenverlauf darstellen. Sie nimmt bei den beiden Überproduzenten ab dem dritten Tag im Vergleich zum Wildtypen exponentiell zu und hat ihr Maximum am siebten Tag erreicht. Zu diesem Zeitpunkt bildet die Mutanten 422 ca. 26 (2,6 mg/l) mal soviel Myxothiazol wie der Wildtyp (0,1 mg/l) und die Mutante 348 wiederum 30 mal soviel (3,0 mg/l). Der Zeitverlauf beim Anstieg und Erreichen des Maximums der Myxothiazol-Produktion verläuft bei den beiden Mutanten nahezu identisch. Bei einer Generationszeit von ca. 5 Stunden erreichen die Kulturen nach 40 Stunden eine Zelldichte von $5,1 \cdot 10^8$ Zellen/ml (50 ml Tryptonkultur mit $2 \cdot 10^6$ Zellen/ml beimpft) und gehen dann in die stationäre Wachstumsphase über. Ab diesem Zeitpunkt nimmt die Produktion des Sekundärmetaboliten gegenüber dem Wildtypen exponentiell zu. Die ermittelten Werte für die Vergleichsmutante Mut133 waren zum Wildtypen identisch, so dass in der Abbildung nur die Werte des Wildtypen abgebildet sind. Die berechneten Mengen, die von den jeweiligen Mutanten gebildet wurden, konnten durch eine HPLC-MS Analyse bestätigt werden (H. Steinmetz; persönliche Mitteilung).

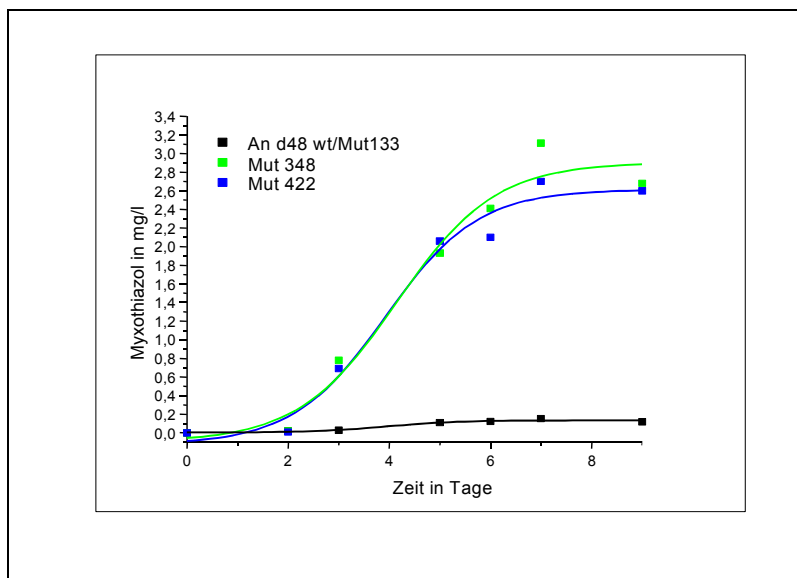


Abb. 38: Kinetik zur Myxothiazol-Produktion in den Überproduzenten Mut348 und Mut422 im Vergleich zum *A. disciformis* An d48 Wildtypen. Dargestellt ist die ermittelte Myxothiazol-Konzentration aus Extrakten von 50 ml Kulturen (in mg/l) in Abhängigkeit zur Zeit.

3.6.4 Untersuchung der Gensequenzen in den Myxothiazol-Überproduzenten durch Primer-walking

Aus den beiden Mutanten Mut348 und Mut422 wurde mittels Primer-walking die genomische Region um die Insertionsstelle des *Himar1* Elements bestimmt. Dabei sollte die vollständige Sequenz des jeweiligen Gens erhalten werden, das für die Regulation der Myxothiazol-Biosynthese verantwortlich ist. Von den erhaltenen Sequenzinformationen der ausklonierten Transposon-Plasmide wurden neue Oligonucleotide für die weitere Sequenzierung des jeweiligen Plasmids abgeleitet (Tab. 2.3.5) und dadurch die Sequenz zu beiden Seiten der Transposon-Insertionsstelle doppelsträngig bestimmt. Abb. 39 zeigt das Ergebnis der Frame-Plot Analyse des relevanten Sequenzbereiches aus der Mutante Mut348. Die Insertionsstelle des *Himar1* abgeleiteten Elements *magellan4* liegt in diesem Diagramm-Ausschnitt bei Basenpaar 2032. Insgesamt wurden 3737 Basenpaare aus dem Genom (bzw. Plasmid) sequenziert. Im Diagramm ist der prozentuale GC-Gehalt der codierenden Triplets an dritter Position der einzelnen Leserahmen gegenüber der Gesamtsequenz angegeben. Myxobakterielle Gene besitzen einen durchschnittlichen Gesamt-GC-Gehalt von 69% und weisen innerhalb kodierender Bereiche in der dritten Codon-Position einen GC-Gehalt von ca. 90% auf (Shimkets, 1993). Diese Tatsache dient zur Identifizierung der ORFs bzw. kodierenden Genen. Oberhalb des Diagramms sind die identifizierten Leserahmen abgebildet. Die Transposition hat in ein Gen stattgefunden, das Ähnlichkeiten zu einem Response-Regulator aus einem Zwei-Komponenten-Hybrid-System (Blauer Pfeil) besitzt. Der Leserahmen vor dem Response-Regulator codiert für eine Histidin Kinase, die zu diesem Zwei-Komponenten-System gehört. Der veränderte Phänotyp der Mutante348 kann nur durch die Inaktivierung dieses Regulations-Systems begründet sein. Der folgende Leserahmen weist Homologien zu einem Transkriptions-Repressor auf. Da dieses Gen auf dem anderen Strang der DNA-Doppelhelix kodiert liegt, kann die Transkription dieses Gen nicht durch die Insertion des Transposons beeinflusst worden sein. Das Gen vor dem Zwei-Komponenten-System weist keine signifikanten Homologien zu bekannten Gensequenzen auf. Es kodiert ein Protein mit hypothetischer Funktion.

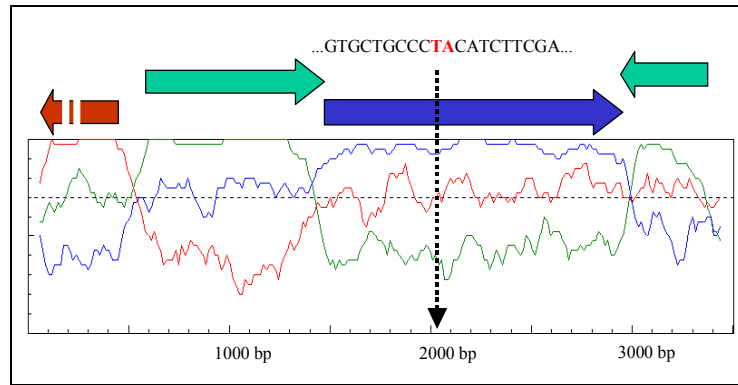


Abb. 39: Frame-Plot Diagramm vom genomischen Sequenzbereich aus Mut348. Die gestrichelte Linie entspricht einen GC-Gehalt von 69,1% in dritter Position codierender Triplets. Die farbigen Linien geben dabei den Verlauf des GC-Gehaltes in den einzelnen Leserahmen wieder. Zur Verdeutlichung sind die identifizierten Gene oberhalb des Diagramms dargestellt. Sie kodieren in der Reihenfolge von links nach rechts für: hypothetisches Protein (GC-Gehalt in dritter Codon-Position von 92,4%); Histidin Kinase (97%); Response-Regulator (95,1%) und einem Transkriptions Repressor (84,3%). Die Insertionsstelle des Transposons mit dem Dinucleotid TA und angrenzenden Basenpaaren ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

In Abb. 40 ist das „Frame-Plot Diagramm“ mit der dazugehörigen Sequenzauswertung aus dem Genom (bzw. Plasmid) der Mutante Mut422 zu sehen. Das *magellan4* ist in dieser Mutante bei Basenpaar 863 in ein Gen mit hypothetischer Funktion transponiert. Insgesamt wurden 3165 Basenpaare sequenziert, wobei hier ein Ausschnitt des entsprechenden Bereichs gezeigt ist. Sowohl für diesen Leserahmen, als auch den stromabwärts folgenden konnten keine signifikanten Homologien zu bekannten Gensequenzen aufgezeigt werden. Die Inaktivierung eines dieser Gene muss für die phänotypische Veränderung gegenüber dem Wildtypen verantwortlich sein.

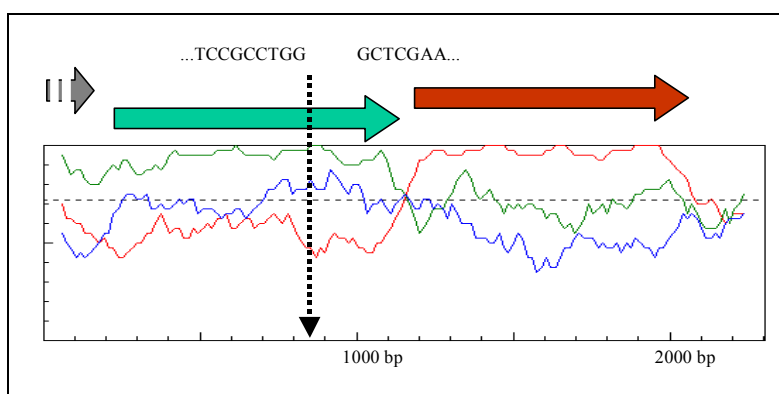


Abb. 40: Frame-Plot Diagramm vom genomischen Sequenzbereich aus Mut422. Die gestrichelte Linie entspricht einen GC-Gehalt von 69,1 % in dritter Position codierender Triplets. Die farbigen Linien geben dabei den Verlauf des GC-Gehaltes in den einzelnen Leserahmen wieder. Zur Verdeutlichung sind die identifizierten Gene oberhalb des Diagramms dargestellt. Beide Gene codieren jeweils ein Protein mit hypothetischer Funktion (GC-Gehalt in dritter Codon-Position von 95,1% (grün) bzw. 93,1% (rot)). Die Insertionsstelle des Transposons mit dem Dinucleotid TA und angrenzenden Basenpaaren ist durch den Pfeil gekennzeichnet.

4 Diskussion

Naturstoffe mit einer antimitotischen Wirkung sind schon seit langer Zeit von Interesse für die Wissenschaft. Das Interesse beruht sowohl auf ihre Wirkung als Toxine, wie auch der Einsatzmöglichkeit als Therapeutika bei verschiedenen Krankheiten, speziell in der Krebstherapie. Die meisten dieser Naturstoffe haben eine spezifische Wirkung auf die Zellmikrotubuli, indem sie diese entweder stabilisieren oder für deren Auflösung verantwortlich sind. Beim Vergleich der verschiedenen Wirkstoffe, für die eine spezifische Wirkung gegen das Mikrotubuli-Netzwerk nachgewiesen wurde, fällt eine große strukturelle Vielfalt auf. Dazu zählen die Vinca-Alkaloide, Taxoide, eine Gruppe um die bekannten Vertreter Colchicin und Podophyllotoxin und verschiedenen Heterozyklen wie Benzimidazolcarbamate. Des weiteren gehören auch den Steroiden zugehörige Wirkstoffe dazu, sowie Vertreter weiterer Naturstoffklassen, die zum größten Teil aus Pflanzen isoliert wurden sind. Da die Mikrotubuli für die Bildung des Spindelapparats während der Zellteilung einer eukaryontischen Zelle verantwortlich sind, besitzen diese Stoffe eine cytostatische bzw. antimitotische Wirkung. Aufgrund der erhöhten Teilungsaktivität sind Krebszellen besonders von den antimitotischen Wirkungen der aufgeführten Naturstoffe betroffen.

Aus den Myxobakterien wurden drei weitere Substanzklassen identifiziert, die eine spezifische Wirkung auf das Mikrotubuli-Netzwerk haben. Der wohl bekannteste Vertreter ist das Epothilon (Bollag *et al.*, 1995), welches sich zur Zeit in der III klinischen Testphase befindet und als vielversprechendes Therapeutikum in der Krebstherapie gilt. Des weiteren handelt es sich um das Disorazol A₁ (Elnakady *et al.*, 2004) sowie die Tubulysine (Sasse *et al.*, 2000). Aufgrund der hohen Cytotoxizität der Tubulysine, die bei Säugerzellen im pikomolaren Bereich liegt (IC₅₀ 0,02-1 pg/l), sind diese von großem Interesse als potentielle Cytostatika in der Krebstherapie. Aufgrund der geringen therapeutischen Breite der Tubulysine müssen jedoch Derivate isoliert bzw. erzeugt werden, die als Therapeutika in der Krebsforschung Einsatz finden könnten.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung und die Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters, um Erkenntnisse über den Aufbau des Genclusters und damit die Biosynthese dieses Naturstoffes zu gewinnen. Diese Einsichten sollen in näherer Zukunft als Grundlage für biokombinatorische Experimente dienen, mit deren Hilfe eine gezielte Derivatisierung der Tubulysine erreicht werden könnte.

Zu Beginn dieser Arbeit stand lediglich der Bakterienstamm *S. erecta* Pd e68 als Tubulysin-Produzent zur Verfügung. Im Folgenden kamen mit *Cystobacter ferrogeneos* Cb fe22, *Cystobacter minor* Cb m20, *Cystobacter violaceus* Cb vi63 und *Angiococcus disciformis* An d48 fünf weitere Tubulysin-Produzenten hinzu. Für keinen dieser Stämme waren molekularbiologische Methoden etabliert und es war nichts über die Genetik der Naturstoffproduktion bekannt. Daher mussten zunächst die Wachstumsbedingungen der einzelnen Bakterienstämme optimiert und ein Mutageneseprotokoll etabliert werden.

4.1 Versuch der Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in *Stigmatella erecta* Pd e68

Die Struktur und absolute Konfiguration der Tubulysine wurde mittels Fütterungsversuchen und Totalsynthese aufgeklärt (Steinmetz, 2004). Tubulysin ist ein Depsipeptid, das aus fünf zum Teil ungewöhnliche Aminosäuren und zwei Acetat-Einheiten besteht, welches durch zusätzliche Methylierungen, Hydroxylierungen und Acetylierungen modifiziert wird (s. 1.5). Aufgrund dieser Strukturmerkmale wurde für die Tubulysin-Biosynthese ein Multienzymkomplex postuliert, der von einem gemischten PKS-/NPRS-Gencluster kodiert wird.

Zu Beginn dieser Arbeit war ein derartiges Hybrid-Gencluster nur aus der Myxothiazol-Biosynthese bekannt (Silakowski *et al.*, 1999), wodurch sich für die Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *Stigmatella erecta* Pd e68 zwei Strategien ergaben:

1. Erstellen einer Cosmidbank und Demaskierung von Cosmiden, die sowohl PKS- als auch NRPS-Gene enthalten. Diese Cosmide sollten entweder Teile des Tubulysin- oder des Myxothiazol-Biosynthesegenclusters tragen (*S. erecta*

Pd e68 produziert neben Tubulysin die Naturstoffe Myxothiazol, sowie Myxalamid und Aurachin).

2. Erzeugen einer Tubulysin negativen Mutante durch homologe Rekombination.

Beide Strategien benötigten PKS- und NRPS-Fragmente aus dem Genom von *S. erecta* Pd e68. Diese Fragmente wurden durch eine PCR-Reaktion mit degenerierten Primern, die auf NRPS- bzw. PKS-Sequenzen abzielen, von der chromosomalen DNA aus *S. erecta* Pd e68 amplifiziert.

4.1.1 Hybridisierung der Cosmidbank aus *S. erecta* Pd e68 zur Auffindung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters

Durch erste Hybridisierungen der Cosmidbank aus *S. erecta* Pd e68 mit heterologen und homologen PKS-/NRPS-Sonden konnten zunächst zwei unterschiedliche Gruppen von je fünf Cosmiden identifiziert werden (s. 3.1.1). Über weitere Hybridisierungen und Sequenzierungen wurde gezeigt, dass diese Teile des Myxalamid- (GAX40, 41, 42, 43 und 50) bzw. des Myxothiazol-Genclusters (GAX13, 14, 20, 24 und 39) tragen. Sowohl die heterologen Sonden, als auch die homologe PKS-Sonde (außer pPKGAS1.4) enthielten Fragmente des Myxothiazol- und des Myxalamid-Biosynthesegenclusters. Somit kam es hauptsächlich zu einer Demaskierung von Cosmiden, die Sequenzabschnitte eines dieser Biosynthesegencluster enthalten. Da die Hybridisierungen aber unter nicht stringenten Bedingungen durchgeführt wurden, hätten weitere Cosmide mit ähnlichen Sequenzabschnitten identifiziert werden können. Des weiteren wurden mit dem degenerierten NRPS-Primern (s. Tab. 2.3.4) Fragmente aus dem Chromosom von *S. erecta* Pd e68 amplifiziert und als Sonde eingesetzt, welche keinem bekannten Gencluster zugeordnet werden konnten.

Durch erneute Koloniehybridisierungen der Cosmidbank aus *S. erecta* Pd e68 mit der homologen NRPS-Sonde wurden drei Cosmide (GAX75, 102 und 126) identifiziert, die mindestens eines der homologen NRPS-Fragmente enthielten. Weitere Hybridisierungen und PCR-Analysen dieser drei Cosmide ließen keine Aussagen über die genetische Herkunft der DNA-Inserts zu. Wiederholte Hybridisierungen mit unterschiedlichen Sonden ergaben bei unterschiedlichen Hybridisierungstemperaturen

und nach erneuten Markierungen der Sonden zu schwache und widersprüchliche Signale.

Im Laufe dieser Arbeit wurde deutlich, dass viele gemischte NRPS-/PKS-Gencluster als Matrize für Enzymkomplexe zur Bildung von Sekundärmetaboliten in Myxobakterien existieren (Gerth *et al.*, 2003; Silakowski *et al.*, 2001a). Silakowski *et al.* (2000) zeigten, dass der Myxalamid bildende Multienzymkomplex ebenfalls durch ein NRPS-/PKS-Hybridgencluster kodiert wird. Somit war es wahrscheinlich, dass im Genom von *S. erecta* Pd e68 weitere Hybrid-Gencluster außer denen des Tubulysins, Myxalamids und Myxothiazols vorhanden sind. Durch diesen Wissensstand und begründet durch die widersprüchlichen Hybridisierungsergebnisse wurde dieser Ansatz zur Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters eingestellt.

4.1.2 Versuche zur Erzeugung einer nicht Tubulysin produzierenden Mutante von *S. erecta* Pd e68

Die Erzeugung einer nicht Tubulysin produzierenden Mutante von *S. erecta* Pd e68 sollte über Elektrotransformation eines homologen Fragments in die Bakterienzellen erfolgen. Für die Elektroporation von *S. erecta* Pd e68 wurden zunächst Bedingungen gewählt, unter denen bereits eine erfolgreiche Transformation von *S. aurantiaca* Sg a15 nachgewiesen wurde (Beyer *et al.*, 1999). Als Mutagenese-Plasmide wurden in diesen Versuchsreihen die Plasmide pPSGAS5.4 und pKSGAS2.1 eingesetzt.

Da unter den für *S. aurantiaca* Sg a15 optimierten Transformationsbedingungen keine Mutante von *S. erecta* Pd e68 erzeugt werden konnte, sollte das Mutageneseprotokoll modifiziert werden. Aufgrund eines „adaptierten“ Wachstumsverhalten von *S. erecta* Pd e68 in Flüssigkultur (s. 3.1.2), konnten nur technische Parameter zur Optimierung der Elektrotransformation geändert werden. Durch die Bildung von kugelförmigen Aggregaten lagen die Zellen nur für kurze Zeit vereinzelt in den Flüssigkulturen vor und es konnte somit nicht die Wachstumsphase oder eingesetzte Zellzahl für eine Transformation bestimmt und geändert werden. Elektronenmikroskopische Aufnahmen dieser Aggregate zeigen eine organisierte Anordnung der Bakterienzellen innerhalb einer extrazellulären Matrix (s. Abb. 41). In hoher Auflösung ist zu erkennen, dass die

Zellen durch eine Art Exocytose (Bildung von „blebs“) Vesikel abschnüren. Durch diese Vesikel könnte eine interzelluläre Kommunikation zwischen den Bakterienzellen stattfinden und somit die Anordnung und Komplexität der kugelförmigen Aggregate erreicht werden. Ob auf diese Weise Sekundärmetabolite aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden, oder diese die Membran frei passieren, ist spekulativ. Der Wirkort der Tubulysine innerhalb der eukaryontischen Zelle weist auf eine hohe Permeabilität der Zellmembranen für solche Strukturen hin, die ebenfalls in der produzierenden Bakterienzelle bestehen kann. Ein aktiver Transport der Tubulysine aus der Bakterienzelle könnte jedoch über einen von *orf2* kodierten ATP-abhängigen Anionentransporter (s. 3.3.7, S.91) erfolgen. Eine Inaktivierung dieses ORF könnte Hinweise darauf geben, ob das Genprodukt eine Funktion beim Austransport der Tubulysine aus der Bakterienzelle hat.

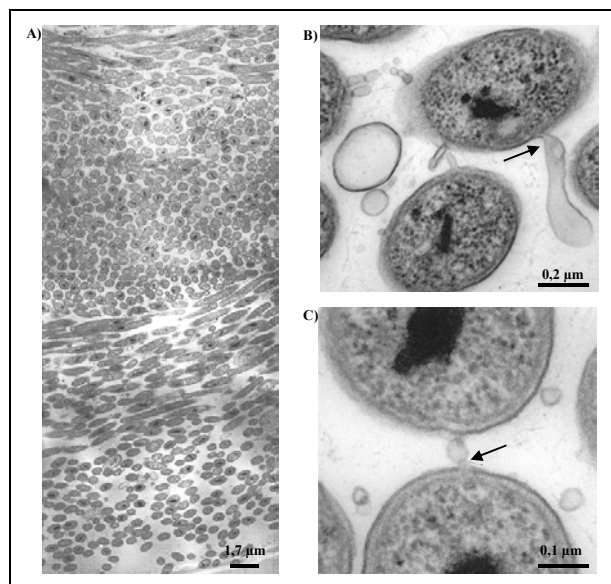


Abb. 41: Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. erecta* Pd e68. A) Querschnitt durch ein kugelförmiges Aggregat von *S. erecta* Pd e68. Die Bakterien liegen in diesem Aggregaten hoch organisiert vor und bilden Schichten (Lamellen), in denen sie kreuzweise zueinander ausgerichtet sind. B) und C) sind Vergrößerungen einzelner Zellen und zeigen die Bildung der „blebs“ (durch Pfeile markiert).

Die Versuche zur Optimierung der Elektrotransformationsbedingungen für *S. erecta* Pd e68 durch Veränderung der technischen Parameter (Spannungsreihe) wurden durch spontane Kanamycin-Resistenz der mutmaßlich erstellten Klone erschwert. Über einen Sensitivitätstest von *S. erecta* Pd e68 gegenüber verschiedenen anderen Antibiotika konnte kein alternativer Selektionsmarker gefunden werden. Durch das Fehlen eines

guten Selektionsmarkers konnte die Etablierung eines Mutageneseprotokolls für *S. erecta* Pd e68 in dieser Arbeit nicht erzielt werden.

Zu diesem Zeitpunkt standen mit *C. ferrogeneos* Cb fe22, *C. minor* Cb m20, *C. violaceus* Cb vi63 und *A. disciformis* An d48 fünf weitere Tubulysin-Produzenten zur Verfügung. Da parallel für diese Stämme eine erfolgreiche Transformation mit dem Transposon pMycoMar gezeigt werden konnte, sollte die Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus einem dieser Stämme über Transposonmutagenese erfolgen. Neben einer erfolgreichen Elektrotransformation wurde für diese Bakterienstämme gezeigt, dass Kanamycin ein guter Selektionsmarker ist.

4.2 Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters aus *A. disciformis* An d48

4.2.1 Erstellen einer Transposon-Mutantenbank unter Verwendung des *HimarI* abgeleiteten Minitransposons *magellan4*

Das Myxobakterium *A. disciformis* An d48 zeigte bei den Transformationen mit dem Transposon pMycoMar die höchste Effizienz mit 125 Klonen/2 µg eingesetzte DNA (s. 3.2). Da sowohl aus diesem Stamm, als auch aus *S. erecta* Pd e68 keine Sequenzinformationen über das Tubulysin-Biosynthesegencluster bekannt waren, wurde eine Transposon-Mutantenbank von *A. disciformis* An d48 zur Auffindung des Genclusters erzeugt.

Das *HimarI* abgeleitete Minitransposon *magellan4* besitzt für die Transposition in ein Wirtsgenom eine TA Dinukleotid-Erkennungssequenz. Aufgrund dieser kurzen Erkennungssequenz kann das Transposon durch eine bestimmte Anzahl an erzeugten Mutanten theoretisch in jedes Gen des Wirtsgenoms transponiert sein und dieses inaktivieren. Myxobakterielle Genome besitzen in der Regel eine Gesamtgröße von ca. 10 Mbp (Pradella *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 1990). Dies entspricht in etwa der 250fachen Größe des Tubulysin-Biosynthesegenclusters, das hypothetisch eine Größe von 40 kb besitzen sollte (s. 1.6, S.16). Unter der Voraussetzung, das alle Bereiche des Genoms gleich effizient mutagenisiert werden, sollte statistisch in einer aus 250

Transposon-Mutanten von *A. disciformis* An d48 eine Transposition in das Tubulysin-Biosynthesegencluster stattfinden und somit zu einer Tubulysin negativen Mutante führen. In einer Mutantenbank von 1000 Klonen müssten demzufolge statistisch vier Transformanten erzeugt werden, die kein Tubulysin mehr produzieren. Da es sich bei diesen Werten um reine Annäherungen handelt, wurde eine Transposon-Mutantenbank von insgesamt 1200 Klonen erzeugt, um mit hoher Wahrscheinlichkeit eine nicht produzierende Mutante isolieren zu können.

4.2.2 Identifizierung von Tubulysin negativen Mutanten mittels Cytotoxizitätstest

Tubulysin wird von Myxobakterien nur in sehr geringen Mengen (ca. 1 mg/l) produziert. Zudem erschwert ihr niedriger Extinktionskoeffizient die Detektion bei der DAD-gekoppelten HPLC-Analyse, weshalb die Tubulysine nur aus Extrakten von Großkulturen (durch Fermentation) über diese Methode nachgewiesen werden können. Aus diesem Grund wurde für die Identifizierung einer nicht Tubulysin produzierenden Mutante in dieser Arbeit ein biologischer Assay (Cytotoxizitätstest) verwendet, der ursprünglich für den Nachweis bzw. zur Charakterisierung der Wirkungsweise von Tubulysin etabliert wurde (Sasse *et al.*, 2000). Eine Inkubation eukaryontischer Zellen mit Tubulysin führt dabei zum Abbau des Mikrotubuli-Netzwerks in den Zellen. Die daraus resultierende Zellkernfragmentierung ist lichtmikroskopisch nachweisbar. In diesem Zelltest können aufgrund der hohen Cytotoxizität bereits sehr geringe Konzentrationen an Tubulysin nachgewiesen werden. Die minimale Hemmkonzentration beträgt ca. 20-30 pg/ml (Frank, 2003).

Aufgrund der niedrigen Nachweisgrenze von Tubulysin sollten die Kulturextrakte der 1200 Transposon-Mutanten in einem solchen Cytotoxizitätstest analysiert werden. Dazu wurden alle Mutanten in Mikrotiterplatten kultiviert und Extrakte aus den Kulturüberständen gewonnen. Sämtliche Extrakte wurden anschließend in einem Cytotoxizitätstest auf eine Tubulysin-Wirkung auf eukaryontische Zellen untersucht. In vier der untersuchten Extrakte konnte nach Inkubation mit L929 Zellen keine typische Tubulysin-Wirkung festgestellt werden. In der Transposon-Mutantenbank konnten demnach vier Tubulysin negative Mutanten identifiziert werden.

4.2.3 Genotypische Analyse der Tubulysin negativen Mutanten

Für die identifizierten der Tubulysin negativen Mutanten konnte nach Ausklonierung der an das Transposon angrenzenden DNA-Sequenzen gezeigt werden, dass die Transposition in das Tubulysin-Biosynthesegenclusters stattfand. Nach der Sequenzierung des gesamten Tubulysin-Biosynthesegenclusters konnten die Integrationsorte des Transposon *magellan4* im Genom dieser vier Tubulysin Knockout-Mutanten bestimmt werden (s. Abb. 42).

Der Anteil der Basen T und A beträgt im Tubulysin-Biosynthesegencluster 29,5%. Die Dinukleotidabfolge TA kommt dabei in der Genclustersequenz nur 403 Mal vor, was auf die Gesamtgröße von ca. 40 kb statistisch gesehen alle 98 Basenpaare auftritt und ca 1% aller möglichen Dinukleotidabfolgen entspricht. Dieser prozentuale Anteil ist in den ORFs des gesamten Biosynthesegenclusters ungefähr gleich ($\pm 0,1\%$), so dass ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der Integrationsorte des Transposons über das gesamte Gencluster erwartet wurde. Tatsächlich fand die Transposition im Genom von drei der vier identifizierten Mutanten (MutT929, 781 und 794) innerhalb eines 1.121 bp großen Bereichs von *tubB* statt. Die Integrationsstelle der Mutante MutT176 liegt 17.261 bp stromabwärts in *tubD*. Diese „Fokussierung“ der Transposition innerhalb des kleinen Genabschnitts könnte aufgrund der geringen Anzahl an Mutanten rein zufällig sein. Darüber hinaus wäre denkbar, dass weitere Faktoren neben der Erkennungssequenz eine Rolle für die Integration des Transposons in das Wirtsgenom spielen (z.B. das Methylierungsmuster der DNA-Sequenz).

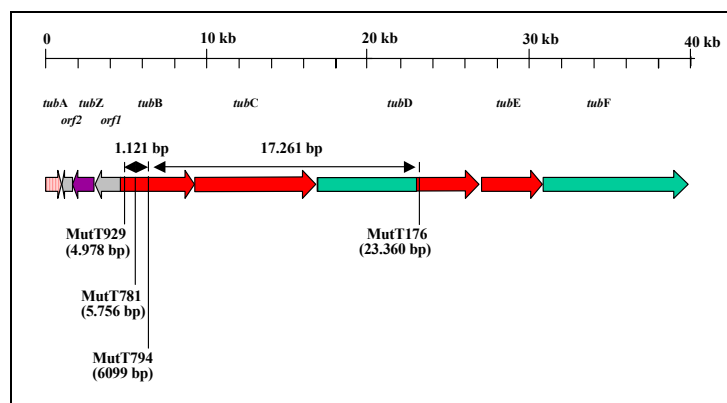


Abb. 42: Insertionsstellen des *magellan4* innerhalb des Tubulysin-Biosynthesegenclusters der verschiedenen nicht Tubulysin produzierenden Mutanten. Angegeben sind die Positionen der TA-Dinukleotidabfolge, in die die Integration des Transposons im Genom der verschiedenen Mutanten stattgefunden hat.

4.3 Modell der Tubulysin-Biosynthese

Die detaillierte Sequenzanalyse des Tubulysin-Biosynthesegenclusters lässt Rückschlüsse auf die Biosynthese dieses Sekundärmetaboliten zu. Das Gencluster zeigt einen für Typ I PKS-/NRPS-Hybridcluster charakteristischen modularen Aufbau (Du *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 2001). In diesen Systemen erfolgt die Biosynthese colinear, d.h. jedes Modul ist für den Einbau einer bestimmten Einheit in den Naturstoff verantwortlich (s. Abb. 43). *In silico* Analysen dieser aus einzelnen Domänen bestehenden Module zeigten, dass die Anordnung einiger Domänen von der bislang in der Literatur beschriebenen Domänenorganisation abweicht (Cane & Walsh, 1999; Hopwood, 1997). Dies zeigt einige neue Aspekte in der PKS- und NRPS-Biosynthese auf.

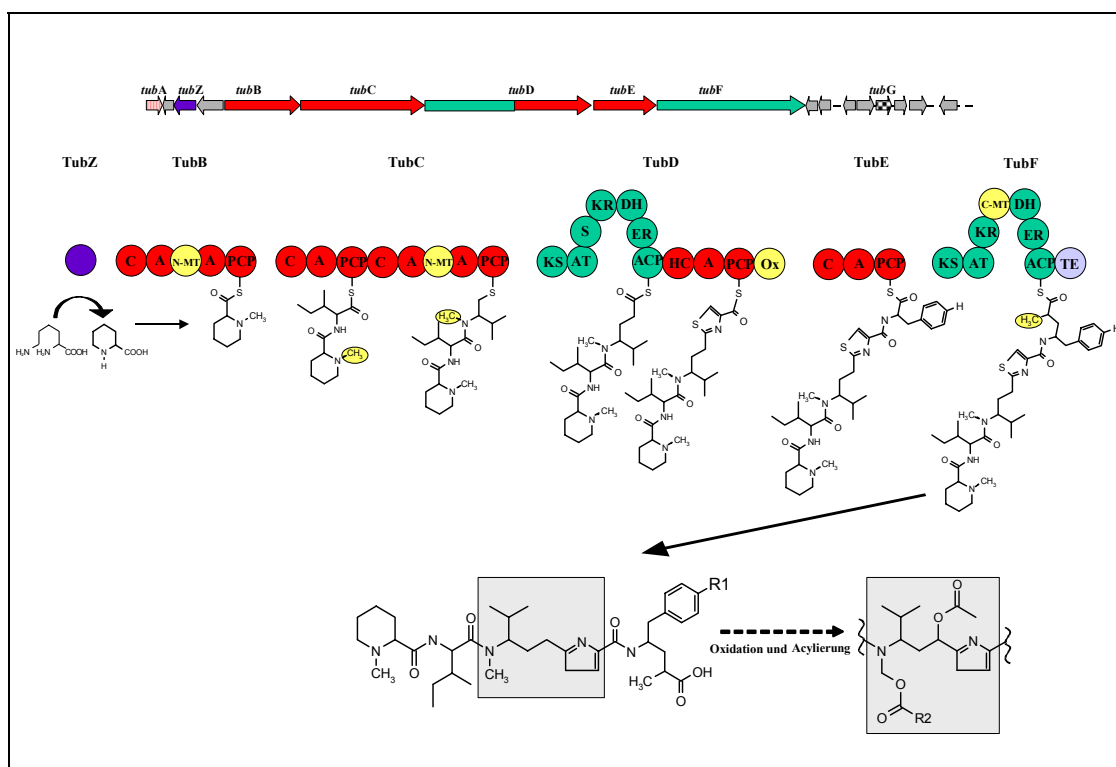


Abb. 43: Modell der Tubulysin-Biosynthese. Abgebildet sind die postulierten Intermediate der Biosynthese bis zur Bildung des Tubulysins. Im unteren Abschnitt ist die Tubulysin-Grundstruktur zu sehen, wie sie hypothetisch nach der Abspaltung vom Multienzymkomplex vorliegt. Diesem Molekül „fehlen“ sowohl zwei Hydroxy- als auch Acylgruppen. Der Bereich, in dem die fehlenden Gruppen im Tubulysinmolekül inkorporiert sind, ist grau unterlegt. Die farbliche Unterscheidung und die Abkürzungen der Gene bzw. Domänen sind in Abb. 16 (S. 93) angegeben. Das Gen *tubG* (schwarz kariert) kodiert für eine Acyltransferase, die wahrscheinlich nicht zum Tubulysin-Biosynthesegencluster gehört (s. 3.4.3, S.119).

Die Tubulysin-Biosynthese startet vermutlich mit der Bildung von Pipecolinsäure. In vorherigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese aus L-Lysin gebildet wird (Wickwire, 1990). Des weiteren zeigten Khaw *et al.* (1998) im Rapamycin Produzenten *Streptomyces hygroscopicus* durch frameshift-Mutagenese, dass die Pipecolinsäure abhängig von einem von *rapL* kodierten Enzym gebildet wird. Dieses Enzym weist hohe Sequenz-Homologien zu Ornithin-Cyclodeaminasen auf, welche die Umsetzung von Ornithin zu Prolin katalysieren. Das Gen *tubZ* aus dem Tubulysin-Biosynthesegencluster weist ebenfalls zu diesen Cyclodeaminasen, wie auch *rapL* hohe Sequenzhomologien auf (s. Tab. 3.3.3). Daher wird angenommen, dass *tubZ* für eine Lysin-Cyclodeaminase kodiert, die Lysin zu Pipecolinsäure umsetzt (s. Abb. 44).

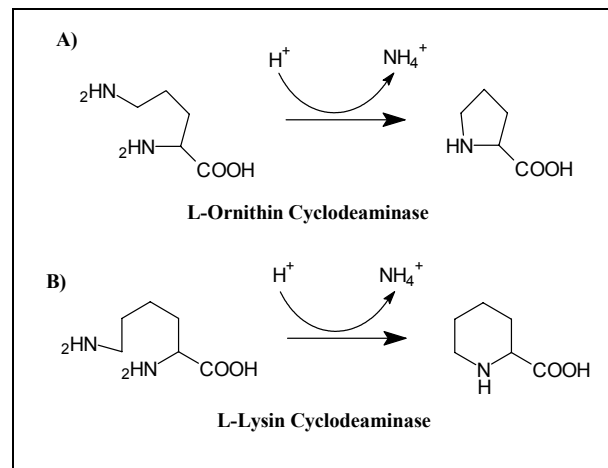


Abb. 44: Hypothese zur Umsetzung von L-Lysin zu Pipicolinsäure (Molnar *et al.*, 1996) (A) Die Umsetzung von L-Ornithin zu L-Prolin durch eine Ornithin Cyclodeaminase (Muth & Costilow, 1974). (B) Die postulierte Umsetzung von L-Lysin zu Pipicolinsäure durch eine Lysin Cyclodeaminase.

Die Pipecolinsäure wird als Startereinheit auf das von *tubB* kodierte erste NRPS-Modul (Lademodul) transferiert und durch eine integrierte N-MT methyliert. In Vorläufer-dirigierten Biosyntheseexperimenten mit dem Rapamycin-Produzenten wurde gezeigt, dass eine Inaktivierung des die Cyclodeaminase kodierenden Gens *rapL* sowohl durch Pipecolinsäure als auch durch Prolin komplementiert werden kann (Khaw *et al.*, 1998). Das Enzym PIE (**P**ipicolat **I**ncorporating **E**nzyme), welches in der Rapamycin-Biosynthese Pipecolinsäure in das wachsende Intermediat einbaut, besitzt demnach eine erweiterte Substratspezifität. Analog zu diesen Ergebnissen soll in zukünftigen Experimenten durch eine Inaktivierungen von *tubZ* untersucht werden, ob die

A-Domäne aus TubB ebenfalls neben Pipecolinsäure weitere Substrate akzeptiert. Auf diese Weise könnten neue Tubulysin-Derivate erzeugt werden, die möglicherweise eine größere therapeutische Breite aufweisen oder für chemische Derivatisierungen eingesetzt werden können.

Das Lademodul von TubB besitzt neben einer A-, einer integrierten N-MT und einer PCP-Domäne noch eine zusätzliche C-Domäne. Die Funktion dieser C-Domäne ist wie die der C-Domäne aus TubA in der Tubulysin-Biosynthese unklar. C-Domänen katalysieren in der Regel die Kondensation zweier Aminosäuren, so dass sie in NRPSs normalerweise nur in den Verlängerungsmodulen vorhanden sind (Marahiel, 1997). Ausnahmen bilden dabei die NRPS-Lademodule einiger Lipopeptid-Antibiotika wie sie z.B. in der Surfactin- (Cosmina *et al.*, 1993) und Lichenysin-Biosynthese vorkommen (Konz *et al.*, 1999). Diese C-Domänen katalysieren wahrscheinlich die Kondensation der Fettsäure mit der ersten Aminosäure zum Lipopeptidgerüst. Eventuell könnte die C-Domäne von TubB oder auch die untypische C-Domäne von TubA, die nur die Kernmotive C1 und C2 trägt (s. 3.3.10.1), für eine Acylierung des Tubulysins verantwortlich sein (siehe weiter hinten, S.144).

Im Tubulysinmolekül ist die Pipecolinsäure im Gegensatz zum Rapamycin N-methyliert. Innerhalb der A-Domäne von TubB wurde ein Proteinabschnitt identifiziert, der homolog zu einem konservierten Motiv von S-Adenosyl-Methionin (SAM) Bindestellen ist (Kagan & Clarke, 1994). Die Präsenz dieses Kernmotivs ließ darauf schließen, dass es sich hier um eine MT-Domäne handelt, die für die Methylierung des Stickstoffs der Pipecolinsäure benötigt wird. Im Gegensatz zu den meisten NRPS liegt die N-MT-Domäne nicht zwischen A- und PCP-Domäne (Konz & Marahiel, 1999), sondern wie in der NRPS McyA zwischen den hochkonservierten Motiven A8 und A9 der A-Domäne (Tillett *et al.*, 2000). Hierzu vergleichbar liegen auch die Ox-Domänen in den Myxothiazolsynthetasen MtaD (zwischen A8 und A9) und MtaG (zwischen A4 und A5) integriert in der jeweiligen A-Domäne vor (Silakowski *et al.*, 1999).

Im weiteren Verlauf der Biosynthese wird die N-methylierte Pipecolinsäure um die Aminosäuren L-Isoleucin und L-Valin verlängert. Die beiden dafür benötigten NRPS-Extensionsmodule werden von *tubC* kodiert. Beide Module bestehen aus je einer C-, einer A- und einer PCP-Domäne. Das zweite Modul von TubC enthält zusätzliche

noch eine N-MT-Domäne, die wiederum zwischen den hochkonservierten Motiven A8 und A9 inseriert ist und die N-Methylierung von Valin katalysiert.

Das resultierende Intermediat wird anschließend von der KS-Domäne des ersten Moduls von TubD auf deren mit Malonat beladene ACP-Domäne übertragen. TubD ist ein PKS/NRPS-Hybrid. Im PKS-Modul findet man neben einer KS-, einer AT- und einer ACP-Domäne noch eine sogenannte vollständige „reduzierende Schleife“ (reductive loop; (Staunton & Weissman, 2001)). Diese ist zwischen der AT- und der ACP-Domäne lokalisiert und enthält die reduzierenden KR-, DH- und ER-Domänen. Vervollständigt wird die reduktive Schleife durch eine sogenannte „Spacer-Region“. Durch die Klonierung und Sequenzierung mehrerer Gencluster aus Myxobakterien konnte gezeigt werden, dass in deren PKS-Modulen ER ähnliche Domänen zwischen der DH- und der KR-Domäne mit abgewandelten NADPH-Bindestellen inseriert sind (Silakowski *et al.*, 2001b). Diese sogenannte Spacer-Regionen konnten des weiteren in fast alle PKSs und Fettsäuresynthasen beschrieben werden (Cane, 1997; Smith, 1994). Es wird angenommen, dass sie weniger eine katalytische, als vielmehr eine strukturelle Funktion erfüllen, indem sie die Proteindimere stabilisieren.

Die Domänenorganisation in der reduzierenden Schleife ist im Vergleich zu den aus der Literatur bekannten PKS-Systemen verändert. Im Gegensatz zu einer Domänenanordnung von DH, KR zu ER, liegen die Domänen in TubD folgend dem biochemischen Reaktionsverlauf von KR über DH zu ER vor. Die gleiche untypische Domänenorganisation wurde ebenfalls für die PKS TubF aufgezeigt. Durch den ungewöhnlichen Aufbau der reduzierenden Domänen in TubD liegt die Spacer-Region ebenfalls nicht, wie aus der Literatur bekannt, zwischen der DH- und der KR-Domäne, sondern am Anfang der „reduzierenden Schleife“ zwischen der ACP- und der KR-Domäne. Diese Domänenanordnung muss eine Rolle in der dreidimensionalen Struktur von PKS- bzw. besonders PKS-/NRPS-Hybrid-Systemen spielen und spiegelt die enorme Flexibilität dieser Multienzymkomplexe wider. Obwohl für PKSs gezeigt wurde, dass diese als Dimere vorliegen (Staunton & Weissman, 2001), sind die Daten zur dreidimensionalen Struktur von NRPSs widersprüchlich (Hillson & Walsh, 2003; Hoppert *et al.*, 2001). Für ein Hybridsystem sind bislang keine Daten vorhanden. Die Struktur eines vollständigen PKS-Moduls ist bisher ebenfalls noch nicht aufgeklärt worden. Die Analyse der ungewöhnlichen Domänenanordnung in TubD und TubF

sollte bei der Entwicklung einer dreidimensionalen Vorstellung von NRPS-/PKS-Hybridsystemen berücksichtigt werden.

Die DH-Domäne der reduktiven Schleife von TubD zeigt bezüglich ihrer Sequenz Unterschiede gegenüber bekannten β -Hydroxy-Dehydratasen (s. Abb. 29). Es sind lediglich Teile des hochkonservierten Motivs funktionaler DHs vorhanden (Zhu *et al.*, 2002; Kakavas *et al.*, 1997). Die Reduktion der Ketogruppe am α -Kohlenstoff (Pos. 12) zur Methylengruppe deutet jedoch darauf hin, dass diese DH aktiv ist. Sequenzanalysen der AT-Domäne aus TubD zeigten, dass diese PKS Malonat aktivieren müsste, was mit der Struktur der Tubulysine übereinstimmt. Die Peptidkette wird demnach um eine Acetat-Einheit verlängert und durch die HC-Domäne des zweiten Moduls von TubD auf deren mit Cystein beladene PCP-Domäne übertragen.

Das NRPS-Modul von TubD besteht aus einer HC-, einer Cystein spezifischen A-, einer PCP-Domäne sowie einer Ox-Domäne. Wie für die Epothilonsynthetase EpoB gezeigt wurde, katalysiert die HC-Domäne die Bildung des Thiazolinrings, der von der Ox-Domäne weiter zum Thiazol oxidiert wird (Chen *et al.*, 2001). Ox-Domänen können in NRPSs sowohl hinter der PCP-Domäne lokalisiert (z.B. MtaC, MelC), als auch in der A-Domäne integriert sein (EpoB, MtaD, MelD). Die beiden Ox-Domänen aus MtaC und MelC haben offenbar keine erkennbare Funktion in der Myxothiazol- bzw. Melithiazol-Biosynthese und sind demzufolge vermutlich inaktiv (Weinig *et al.*, 2003b). Da dies die bislang einzigen Beispiele für eine Anordnung der Ox-Domäne hinter der PCP-Domäne darstellten, wurde spekuliert, dass derartig lokalisierte Ox-Domänen generell inaktiv sein könnten (Weinig *et al.*, 2003b). Die Ox-Domäne aus TubD widerlegt diese aufgestellte Vermutung, da sie das erste Beispiel für eine aktive, hinter einer PCP-Domäne gelegene Ox-Domäne ist.

Das folgende NRPS-Modul des Tubulysin-Biosynthesegenclusters wird von *tubE* kodiert und besteht aus einer C-, einer A- und einer PCP-Domäne. Bei der Bestimmung der Substratspezifität der A-Domäne konnte keine Präferenz für eine bestimmte Aminosäure festgestellt werden (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999). Die verschiedenen bislang identifizierten Tubulysine unterscheiden sich in der Struktur an dieser Stelle durch den Einbau von Tyrosin (Tubulysin A und B) oder Phenylalanin (Tubulysin D und E). Über HPLC-Analysen konnten in den Extrakten aller Tubulysin-produzierender Myxobakterien diese vier Tubulysin-Derivate nachgewiesen werden

(H. Steinmetz; persönliche Mitteilung). Die A-Domäne aus TubD scheint demnach eine erweiterte Substraterkennung (Tyrosin und Phenylalanin) zu haben, weshalb ihre Spezifität *in silico* nicht eindeutig bestimmt werden konnte.

Das letzte Modul im Tubulysin-Biosynthesegencluster ist eine PKS. TubF besteht aus acht aktiven Domänen und stellt damit das bislang größte identifizierte PKS-Modul des Typs I dar. TubF enthält analog zu TubD neben einer KS-, einer AT- und einer ACP-Domäne eine vollständige „reduzierende Schleife“. Ihre Domänen-organisation weicht wie bereits erwähnt von der in der Literatur beschriebenen Anordnung ab. Zwischen der KR- und DH-Domäne befindet sich ein Proteinabschnitt mit signifikanten Ähnlichkeiten zu SAM-abhängigen C-Methyltransferasen. Diese C-MT-Domäne katalysiert vermutlich die Methylierung des β -Keto-Intermediats in α -Position (Pos. 26). Der Einbau der drei in Abb. 43 markierten Methylgruppen in das Intermediat wurde über Fütterungsversuche mit ^{13}C -markiertem Methionin bewiesen (Steinmetz, 2004) und stimmt mit der postulierten Funktion der drei charakterisierten MT-Domänen überein. Eine C-MT-Domäne wie sie in der PKS TubF zwischen der KR- und DH-Domäne lokalisiert ist, wurde bislang in der Literatur nicht beschrieben. Die Insertion der MT könnte in Bezug auf die dreidimensionale Struktur des PKS-Moduls einen Einfluss auf den Aufbau der KR-Domäne von TubF haben. Die KR-Domäne weist zwar das hochkonservierte Erkennungsmotiv einer NADPH-Bindestelle auf (Zhu *et al.*, 2002; Kakavas *et al.*, 1997), unterscheidet sich aber dennoch im Vergleich zu anderen KRs (s. 3.3.10.9, S.112). Die NADPH-Bindestelle liegt im Gegensatz zu bekannten KR-Domänen ca. 190 AS weiter zum C-Terminus der Aminosäuresequenz hin verschoben. Die Insertion der C-MT-Domäne könnte eine räumliche Trennung der aktiven Domänen-Zentren im gefalteten Enzymkomplex bewirken. Die ungewöhnliche Lage der NADPH-Bindestelle in der Aminosäuresequenz der KR wäre dadurch mit einer räumlichen Annäherung der Reaktionszentren zueinander in der reduzierenden Schleife von TubF zu erklären. Als Substrat dient der PKS TubF Malonyl-CoA (s. 3.3.10.8, S. 111), das durch die Aktivität der KR-, DH- und ER-Domänen als vollständig reduziertes Acetat in das Tubulysinmolekül eingebaut wird. Interessanterweise wird nicht Methylmalonyl-CoA als Substrat in das Intermediat eingebaut, sondern das inkorporierte Acetat durch die C-MT-Domäne am α -Kohlenstoff nachträglich methyliert. Letzteres erfordert für die Bakterienzelle einen höheren energetischen

Aufwand, da *A. disciformis* An d48 ebenfalls den Naturstoff Myxothiazol bildet und das Bakterium somit höchstwahrscheinlich auch in der Lage ist, Methylmalonyl-CoA als Substrat zu synthetisieren.

Das an der ACP-Domäne von TubF gebundene Intermediat wird schließlich durch die TE-Domäne, welche am C-Terminus von TubF lokalisiert ist, vom Multienzymkomplex als freie Säure abgespalten. Letztens muss noch an den Positionen 11 und 39 hydroxyliert und durch weitere Acylierungen an den resultierenden OH-Gruppen die fertige Tubulysinstruktur gebildet werden (s. Abb. 43). Für die benötigten Oxidationsschritte konnten sowohl innerhalb des Tubulysin-Biosynthesegenclusters, wie auch in den angrenzenden Bereichen keine Gene identifiziert werden, die für die erwarteten P₄₅₀-Monooxygenasen kodieren. In der Literatur gibt es mit dem Maytansin- (Carroll *et al.*, 2002) und dem Pederin-Biosynthesegencluster (Piel, 2002) Beispiele dafür, dass Gene ausserhalb des Genclusters liegen können und die Genprodukte trotzdem einen Teil des jeweiligen Multienzymkomplexs bilden. Ob die „fehlenden“ Monooxygenasen im Tubulysin-Biosynthesegencluster dem analog an einer anderen Stelle des Genoms kodiert werden oder unspezifische Monooxygenasen die Hydroxilierung des Tubulysingerüsts katalysieren ist zur Zeit nicht bekannt. Das Gleiche gilt für die benötigten Acyltransferasen zur Synthese des Endprodukts. Das mit *tubG* bezeichnete Gen stromabwärts vom Tubulysin-Biosynthesegencluster zeigt Homologien zu Acyltransferasen. Durch eine Inaktivierung von *tubG* (s. 3.4.3, S. 119) konnte aber gezeigt werden, dass diese Acyltransferase keine Funktion in der Tubulysin-Biosynthese besitzt. Die katalytische Funktion der „fehlenden“ Acyltransferasen könnte theoretisch durch eine der C-Domänen aus TubA oder TubB übernommen werden. C-Domänen weisen in ihrem Kernmotiv C3 die Aminosäurenabfolge HHxxxDG auf. In vorhergehenden Arbeiten wurde gezeigt, dass dieses Motiv wichtig für die katalytische Wirkung der C-Domänen zur Amidbildung ist (Bergendahl *et al.*, 2002; Stachelhaus *et al.*, 1998). Das gleiche Motiv wurde in Acyltransferasen gefunden, wie z.B. in der Chloramphenicol-Acyltransferase (CAT) und der Dihydrolipoamid Acyltransferase aus der Pyruvat-Dehydrogenase (De Crecy-Lagard *et al.*, 1995). Es wurde gezeigt, dass das zweite Histidin in dieser Konsensussequenz eine wichtige Funktion für Chloramphenicol-Acyltransferase hat und eine Hydroxygruppe des Chloramphenicols für die Übertragung des Acylrestes

aktiviert (Lewendon *et al.*, 1994) . In der C-Domäne von TubA konnte das Kernmotiv C3 nicht identifiziert werden, was gegen eine katalytische Wirkung von TubA als Acyltransferase spricht. Ob die C-Domäne in TubB solch eine Funktion bei der Übertragung eines oder beider „fehlender“ Acylreste auf das Tubulysinmolekül hat, müsste durch eine spezifische Inaktivierung der C-Domäne von *tubB* untersucht werden.

Bei den Sequenzvergleichen der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten A- und den PCP-Domänen fielen Unterschiede zu den aus der Literatur bekannten Konsensusmotiven (Konz & Marahiel, 1999) auf. Allen A-Domänen aus TubB, TubC, TubD und TubF fehlt die hochkonservierte Aminosäure Leucin in der Konsensussequenz des Motivs A2. Im Konsensusmotiv der PCP-Domänen fehlt in sämtlichen TUBs im Vergleich zur Konsensussequenz eine beliebige Aminosäure vor der hochkonservierten Aminosäureabfolge Leucin, Glycin, Glycin. Diese Domänen müssen der Tubulysinstruktur nach aktiv sein. Eine weitere Abweichung ergab der Sequenzvergleich der an der Tubulysin-Biosynthese beteiligten HC-Domäne aus TubD im Konsensusmotiv Z2. Die Sequenzanalyse wurde dabei im Vergleich zu bekannten HC-Domänen aus der Myxothiazol- und der Bleomycinsynthetase durchgeführt und zeigte, dass in der Aminosäureabfolge aller HC-Domänen vier hochkonservierte Aminosäuren im Vergleich zu der bekannten Konsensussequenz fehlen würden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Konsensusmotive eventuell neu definiert werden müssen.

4.4 Optimierungsversuche zur Elektrotransformation von *A. disciformis* An d48

Durch gezielte Inaktivierungen einzelner Gene des Tubulysin-Biosynthesegenclusters sollte deren Funktion in der Biosynthese bestimmt werden. Derartige Mutanten sollten unter Anwendung des Mutageneseprotokolls erzeugt werden, das für die Herstellung der Transposon-Mutantenbank etabliert wurde. In diesen Versuchen konnte gezeigt werden, dass ein Teil der Bakterienzellen durch Elektroporation Fremd-DNA aufnimmt. Die auf dem Plasmid pMycoMar kodierte *Himar1*-Transposase katalysiert die Integration des *magellan4* in das Genom. Diese Transposition findet als gerichteter,

sequenzspezifischer „cut and paste“-Mechanismus um ein Vielfaches häufiger statt, als eine homologe Rekombination. Für die Transformation von *A. disciformis* An d48 mit dem Transposon pMycoMar wurde eine Transformationseffizienz von 125 Klonen/2 µg eingesetzte DNA erreicht (s. 3.2.1.2, S.79), wobei $2 \cdot 10^9$ Zellen für die Elektroporation eingesetzt wurden. Bei einer ermittelten Überlebensrate der Zellen von ca. 80% kommt es daher nur mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. $1:10^7$ zur Integration des Transposons in das Wirtsgenom und somit zur Erzeugung einer Mutante. Dieser theoretische Annäherungswert setzt sich aus dem Ereignis des DNA-Transfers in die Bakterienzelle und dem der Transposition zusammen. Das Ereignis einer homologen Rekombination in *A. disciformis* An d48 sollte daher unter Verwendung des gleichen Mutageneseprotokolls (wenn eine 100-1000 fach geringere Wahrscheinlichkeit für die homologe Rekombination gegenüber einer Transposition angenommen wird) maximal alle 10^9 Zellen auftreten und somit zur Erzeugung von 1-2 Mutanten pro Ansatz führen. Unter diesen Voraussetzungen sollte das Mutageneseprotokoll für die Erzeugung von Mutanten durch homologe Rekombination optimiert werden. Dies sollte durch Veränderung der Elektroporationsbedingungen, der Länge des homologen Bereichs in den eingesetzten Mutageneseplasmiden und Veränderung des physiologischen Zustands der eingesetzten Bakterienkulturen erreicht werden. Die Wahrscheinlichkeit einer Transformation bzw. Mutagenese sollte so im Idealfall um das 10-100 fache gesteigert werden (s. 3.5, S.121). Eine Verbesserung konnte aber im Verlaufe der vorliegenden Arbeit nicht erreicht werden. In den Elektrotransformationen zur gezielten Inaktivierung spezifischer Gene konnten nur durch wiederholte Ansätze vereinzelt Mutanten erzeugt werden. Bei diesen Transformationen wurden verschiedene DNA-Fragmente eingesetzt, die eine Größe von 567-1.629 bp besaßen. Die Anzahl der generierten Mutanten lässt keine Rückschlüsse auf die Bedeutung der variierten Parameter bei der Elektrotransformation zu. Die geringe Transformationseffizienz von *A. disciformis* An d48 könnte unter anderem durch wirtseigene Nukleasen erklärt werden, die die transferierte Fremd-DNA zum Teil schneller abbauen, als eine homologe Rekombination stattfinden kann.

4.5 Geninaktivierungsexperimente im Tubulysin-Biosynthesegencluster durch homologe Rekombination

Die Mutagenese einer Ziel-DNA mittels einfacher homologer Rekombination führt in der Regel zur Inaktivierung des betroffenen Gens (s. 3.3.5, S.87). Da in Typ I PKS-/NRPS-Systemen die Biosynthese colinear verläuft, würde eine Inaktivierung eines internen Gens (*tubB-tubF*) zum Abbruch der gesamten Biosynthese führen. Außer der Inaktivierung des betroffenen Gens hat die Insertion der Fremd-DNA durch polare Effekte (Verschiebung des Leserahmens, Transkriptions-Stop usw.) Auswirkungen auf die nachfolgenden Domänen bzw. Gene, sowie die Gesamtstruktur des Enzymkomplexes. Die Erzeugung einer solchen Knockout-Mutante (Tubulysin negativen Mutante) wurde für die Identifizierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters mit den Mutageneseplasmiden pASTIs1 und pASTIs2 ausgenutzt. Für Funktionsanalysen interner Gene oder separater Domänen des Tubulysin-Biosynthesegenclusters müsste ein Mutageneseprotokoll für *A. disciformis* An d48 etabliert werden, das durch zweifache homologe Rekombination zur Bildung von markerlosen Mutationen führen könnte. Diese Mutationen hätten höchstwahrscheinlich keine Auswirkungen auf nachfolgende Domänen bzw. Gene, sowie die Gesamtstruktur des Enzymkomplexes. Solch ein Mutageneseverfahren konnte in Myxobakterien bisher nur für *M. xanthus* (Ueki *et al.*, 1996; Wu & Kaiser, 1996) und *S. aurantiaca* DW4/3-1 (Weinig *et al.*, 2003a) etabliert werden und wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht für *A. disciformis* An d48 untersucht.

Um die spezifische Funktion eines Genprodukts aus dem Tubulysin-Biosynthesegencluster zu untersuchen, sollten durch einfache homologe Rekombination die am 3'- bzw. 5'-Ende des Biosynthesegenclusters kodierten Gene inaktiviert werden. Zunächst wurde versucht, das die Cyclodeaminase kodierende Gen *tubZ* zu inaktivieren. Bei einer erfolgreichen Inaktivierung sollte durch die Fütterung von Pipecolinsäure-Analoga überprüft werden, ob der Gendefekt durch ähnliche Substrate komplementiert wird und somit eventuell neue Tubulysin-Derivate produziert werden können. Das Gen *tubZ* liegt stromaufwärts vom Strukturgen *tubB* des Biosynthesegenclusters und wird zu diesem in die entgegengesetzte Richtung transkribiert (s. Abb. 43, S.139). *tubZ* wird von den Genen *orf1* und *orf2* flankiert, deren Funktionen bzw. Beteiligung an der

Tubulysin-Synthese unbekannt sind. Da diese Gene in einer Leserichtung mit *tubZ* vorliegen, könnten sie als Operon funktionieren. Um eine mögliche Funktion dieser Genprodukte für die Tubulysin-Biosynthese zu untersuchen, sollten diese Gene ebenfalls durch homologe Rekombination inaktiviert werden. Des weiteren sollten Mutanten mit Inaktivierungen von *tubA* und *tubG* erzeugt werden.

Da keine Verbesserung des Mutageneseprotokolls für eine homologe Rekombination in *A. disciformis* An d48 erzielt wurde, konnten in den verschiedenen Versuchsreihen nur Mutanten mit homologen Insertionen in den Genen *tubZ*, *orf2* und *tubG* erzeugt werden. Bedingt durch die Mutagenesestrategie kann außer für den Inaktivierungsversuch von *tubG* (s. 3.4.3, S.119) keine eindeutige Aussage getroffen werden, ob die Insertion des Mutageneseplasmids tatsächlich zu einer Geninaktivierung des Gens geführt hat. Zur Steigerung der Transformationseffizienz wurden für die Mutagenese von *tubZ* sowie *orf2* verschieden große DNA-Fragmente eingesetzt (s. 3.4, S. 115). In beiden Fällen konnte eine Transformation nur mit Fragmentgrößen >1 kb erzielt werden. Diese DNA-Fragmente sollten bei Vorliegen eines Operons aus den Genen *orf1*, *tubZ* und *orf2* zu einer Inaktivierung von *tubZ* bzw. *orf2* führen (s. Abb. 45). Da die Tubulysin-Produktion in den jeweiligen Mutanten im Vergleich zum Wildtypen von *A. disciformis* An d48 nicht verändert war, ergeben sich verschiedene Interpretationsansätze:

1. Jedes Gen könnte theoretisch separat transkribiert werden, woraus gefolgert werden könnte, dass ein eigenständiger Promotor vor jedem Gen liegt.
2. Durch die Integration des Mutageneseplasmids wird in das Genom jeder auf diese Weise erzeugten Mutante ein weiterer Promotor inseriert, der auf dem Vektoranteil kodiert liegt. Da in dieser Arbeit sämtliche Mutageneseplasmide mit dem pCR 2.1 TOPO-Vektor kloniert wurden, ist das der Promotor *Plac*. Dieser Promotor wird wahrscheinlich von der myxobakteriellen Transkriptionsmaschinerie erkannt (R. Müller; pers. Mitteilung). In Abb. 45 ist die Integration der verschiedenen Mutageneseplasmide in das Genom der jeweiligen Mutante OS2AS3 bzw. OS2AS4 und TZAS1 zu sehen, sowie die Lage des Promotors *Plac* in Bezug zur Transkriptionsrichtung des mutmaßlichen Operons und zu inaktivierenden Gens. Im Genom der Mutante TZAS1 liegt der Promotor *Plac* in Transkriptionsrichtung vor der vollständigen Genkopie von *tubZ*, wodurch die Bindung der RNA-Polymerase

(Holoenzym) am codogenen Strang initiiert und die Transkription gestartet werden könnte. Demgemäß wird *tubZ* wahrscheinlich vollständig transkribiert und das Genprodukt (Lysin-Cyclodeaminase) translatiert. Die Tubulysin-Biosynthese wäre somit in dieser Mutante nicht beeinträchtigt.

3. Bei den Mutanten OS2AS3 und OS2AS4 liegt der Promotor *Plac* invers zur Transkriptionsrichtung von *orf1*. Da die Funktion des Genprodukts unbekannt ist, könnte eine erfolgreiche Inaktivierung des Gens keine phänotypischen Auswirkungen auf die Tubulysin-Biosynthese haben. Die Mutante würde somit im Vergleich zum Wildtypen von *A. disciformis* An d48 die gleiche Menge Tubulysin bilden.

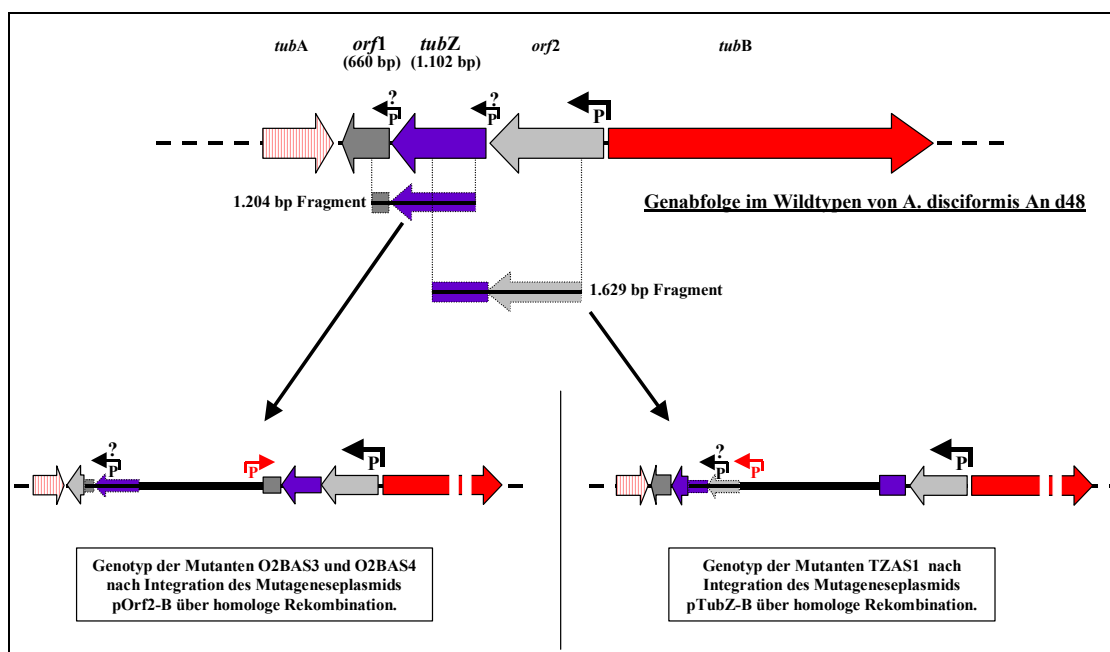


Abb. 45: Vergleich der Genotypen aus den Mutanten OS2AS3 bzw. OS2AS4 und TZAS1. Im oberen Abschnitt der Abbildung ist die Genabfolge *orf1*, *tubZ* und *orf2* aus dem Genom des Wildtypen von *A. disciformis* An d48 zu sehen. Die abgebildeten Promotoren (P) sollen zeigen, dass diese Gene entweder einzeln transkribiert werden oder als Operon von einem vorgeschalteten Promotor (P fett gedruckt) vor *orf2* kontrolliert werden. Darunter ist die Lage und Größe der DNA-Inserts aus den Mutageneseplasmiden pOrf2-B bzw. pTubZ-B gezeigt. Im unteren Bildabschnitt ist der gleiche Genombereich nach der Integration der jeweiligen Mutageneseplasmide abgebildet und die Orientierung (Pfeile) des zusätzlich inserierten Promotors *Plac* (rot markiert) auf dem Vektorenanteil (pCR 2.1 TOPO) des Plasmids.

Um die Funktion der einzelnen Genprodukte durch gezielte Inaktivierungen besser untersuchen zu können, soll in Zukunft das gesamte Tubulysin-Biosynthesegencluster in dem Myxobakterium *M. xanthus* oder einer Gattung der Pseudomonaden heterolog exprimiert werden. Diese Bakterienstämme sind mit *A. disciformis* An d48 verwandt und verwenden bedingt durch einen ebenfalls hohen GC-Gehalt im Genom ähnliche

Codons (GC-reich in dritter Position). Daher sollte nach einer stabilen Transformation des Tubulysin-Biosynthesegenclusters in das Genom eines dieser Bakterienstämme der Tubulysin-Multienzymkomplex exprimiert werden. Eine heterologe Produktion in *M. xanthus* wurde bereits für das Epothilon gezeigt (Arslanian *et al.*, 2002a; Arslanian *et al.*, 2002b). Sowohl für *M. xanthus*, als auch für verschiedene Pseudomonaden existieren hocheffiziente Mutageneseverfahren, durch die eine Charakterisierung der Tubulysin-Biosynthesegene vereinfacht würde.

4.6 Identifizierung und Charakterisierung von Struktur- und Regulationsgenen, deren Genprodukte an der Bildung von Sekundärmetaboliten aus *A. disciformis* An d48 beteiligt sind

4.6.1 Myxothiazol und Angiolam negative Mutanten aus *A. disciformis* An d48

A. disciformis An d48 produziert neben den Tubulysinen die Naturstoffe Angiolam, Myxochelin und Myxothiazol. In der *magellan4* Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 sollten neben Tubulysin negativen Mutanten ebenfalls Transformanten enthalten sein, bei denen die Transposition in das Biosynthesegencluster eines anderen Sekundärmetaboliten stattgefunden hat. Zur Überprüfung dieser These wurden die Extrakte aller 1.200 Mutanten mittels DAD-gekoppelter HPLC im Vergleich zum Wildtypen von *A. disciformis* An d48 auf ein verändertes Metabolitenspektrum hin untersucht. *A. disciformis* An d48 produziert sämtliche Sekundärmetabolite nur in geringen Mengen (<1 mg/l). Da für die Analyse der gesamten Transposon-Mutantenbank Extrakte von 200 µl Kulturen eingesetzt wurden, war durch die HPLC-Analyse nur die Detektion von Myxothiazol und Angiolam möglich. Tubulysin besitzen gegenüber diesen Sekundärmetaboliten einen geringeren Extinktionskoeffizienten und konnten daher mittels DAD-gekoppelter HPLC in diesen Extrakten nicht detektiert werden.

In der gesamten Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 konnten insgesamt vier Transformanten demaskiert werden, bei denen die Produktion eines Sekundärmetaboliten ausgefallen ist. Zwei dieser Mutanten (Mut716 und 800) bilden

kein Myxothiazol mehr und in den Extrakten der anderen beiden Mutanten (Mut550 und 813) konnte kein Angiolam nachgewiesen werden. Für die Myxothiazol negativen Mutanten wurde durch das Ausklonieren des Transposons gezeigt, dass die Transposition des *Himar1*-Elements *magellan4* in das Myxothiazol-Biosynthesegenclusters stattgefunden hat. Die flankierenden Sequenzen aus dem Genom der Angiolam Knockout-Mutanten zeigten keine Homologien zu NRPS bzw. PKS kodierenden Genen, sondern nur zu Proteinen mit unbekannter Funktion. Über HPLC-MS Analysen konnte bestätigt werden, dass diese Mutanten kein Angiolam mehr produzieren. Die Transposition in diesen Mutanten könnte daher in verschiedene regulatorische Elemente stattgefunden haben, die hypothetisch für die Transkription oder Translation des Angiolam-Multienzymkomplex als Aktivatoren eine wichtige Rolle spielen.

4.6.2 Regulatoren der Myxothiazol-Biosynthese in *A. disciformis* An d48

Des weiteren konnten bei der HPLC-Analyse der Transposon-Mutantenbank fünf Mutanten identifiziert werden, deren Produktionsspektrum eine stark erhöhte Menge an Myxothiazol gegenüber dem Wildtypen von *A. disciformis* An d48 zeigten. Folgende Untersuchungen zur Myxothiazol-Produktion wiesen eine 10-30 fach höhere Menge dieses Sekundärmetaboliten in den jeweiligen Extrakten der Mutanten-Kulturen auf. Die Transposition des *magellan4* scheint bei diesen Mutanten in regulatorische Gene stattgefunden zu haben, deren Produkte bei der Myxothiazol-Biosynthese als Repressoren agieren.

Die Sequenzanalysen der angrenzenden genomischen Bereiche zum Integrationsort des Transposons ergab in den zwei Mutanten Mut399 und 422 Homologien zu Proteinen mit hypothetischer Funktion aus *S. coelicolor* (s. Tab. 3.6.1, S. 126). In den Mutanten Mut286 und 649 ist das Transposon in Gene integriert, deren Produkte Ähnlichkeiten zu Proteinen aufweisen, die scheinbar keine bekannten regulatorischen Funktionen haben. Ob in diesen Mutanten die phänotypische Überproduktion des Myxothiazols durch eine direkte Inaktivierung des jeweiligen Gens, oder durch eine transkriptionale Kopplung mit dem folgenden Gen bzw. Genen (Operon) auftritt, kann in diesem Zusammenhang zur Zeit nicht geklärt werden. Bemerkenswert ist, dass bei keiner dieser

Sequenzanalysen Homologien zu bekannten regulatorischen Genen aufgefunden wurden. Das Gleiche gilt für die erzielten Ergebnisse aus den Sequenzanalysen der Angiolam negativen Mutanten. Eine Erklärung dafür könnte die explosionsartige Zunahme an Genbankeinträge aus Sequenzierungen verschiedener Genomprojekte sein. Da die identifizierten ORFs ohne weitere biochemische Charakterisierung in den Datenbanken eingetragen werden, geben die erzielten Ergebnisse dieser Arbeit erste Hinweise auf die Funktion einiger dieser Gensequenzen mit bislang unbekannter Funktion.

Die Sequenzanalyse zur Bestimmung der Transposition des *magellan4* im Genom der Mutante Mut348 zeigte Homologien zu einer Histidin Protein Kinase (HPK). HPKs bilden zusammen mit einem sogenannten „response regulator“ (RR) ein Zwei-Komponenten-System, das während der Signaltransduktion in Pro- und Eukaryonten als häufigstes regulatorisches Element gefunden wird (Grebe & Stock, 1999). Prokaryonten sowie mehrzellige Organismen werden durch eine Flut von internen wie auch externen Faktoren beeinflusst, die korrekt wahrgenommen werden müssen damit die Zelle darauf entsprechend „reagieren“ kann. Die Reaktion auf diese Reize erfolgt durch das aktivieren einer Signaltransduktion und ist daher nicht nur ein essentieller Bestandteil für das Überleben des Organismus bei ständig wechselnden Umweltbedingungen, sondern auch für die Koordination von spezifischen Zell-Zell-Interaktionen. Während es viele verschiedene Signaltransduktionssysteme gibt und diese in ihrer Komplexität stark variieren, funktionieren sie grundsätzlich durch eine kontrollierte Phosphorylierungskaskade, die das Signal weiterleitet. Dies führt zu Änderungen der Genexpression oder zu enzymatischen Reaktionen, wodurch die Zelle zu einer entsprechenden Reaktion befähigt ist. Sowohl in Pro-, wie auch Eukaryonten werden diese Phosphorylierungen durch Protein-Kinasen katalysiert (Hunter, 1995; Alex & Simon, 1994). Diese können durch ihre Sequenzhomologien und enzymatischen Spezifitäten in zwei Gruppen unterteilt werden; die Superfamilie der Serin-, Threonin- und Tyrosin-Kinasen, welche diese Aminosäurenreste spezifisch phosphorylieren (Hunter, 1995; Hanks *et al.*, 1988) und die Superfamilie der Histidin-Kinasen. Letztere autophosphorylieren sich nach Aktivierung an einem hochkonservierten Histidinrest (Alex & Simon, 1994; Stock *et al.*, 1989) und sind Bestandteil von Zwei-Komponenten-Transduktionssystemen. Dieses Grundgerüst kann in seiner Komplexität bei

verschiedenen Transduktionswegen zunehmen (Parkinson & Kofoed, 1992). Der grundlegende Aufbau eines Zwei-Komponenten-Systems besteht aus einer Sensorkinase bzw. HPK sowie einem RR (s. Abb. 46). Die HPKs liegen als Dimere vor und sind über eine Transmembrandomäne mit der Zellwand assoziiert. Nach der „Aufnahme“ eines extrazellulären Signals über eine Sensordomäne wird ein konservierter Histidinrest in der Transmitterdomäne durch deren Kinase-Aktivität autophosphoryliert (Bourret *et al.*, 1993). Erst nach dieser Autophosphorylierung wird der aus ATP stammende Phosphatrest auf einen konservierten Asparaginrest des cytoplasmatischen RR übertragen, der aus weiteren zwei Domänen besteht; einer Empfängerdomäne, in der sich am N-terminalen Ende der konservierte Asparaginrest befindet und zusätzlich einer regulatorischen Domäne (output domain), die das Signal für eine „Antwort“ der Zelle weiterleitet (Parkinson & Kofoed, 1992). In vielen Fällen handelt es sich bei der regulatorischen Domäne um ein DNA-Bindeprotein, wodurch der RR als Transkriptionsfaktor agiert. Die Asparagin-Phosphorylierung kontrolliert dabei die Funktion des RR ob die regulatorische Domäne an der Ziel-DNA bindet oder mit einer anderen Komponente der Transkriptionsmaschinerie interagiert (Hakenbeck & Stock, 1996) und diese positiv oder negativ reguliert. Dabei stellt dieser Regulationsweg in der Regel einen Schaltmechanismus dar, durch welchen die Transkription beeinflusst wird.

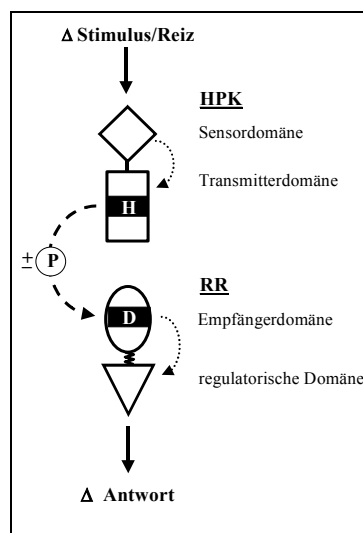


Abb. 46: Aufbau eines „einfachen“ Zwei-Komponenten-Systems. Ein extrazelluläres Signal wird über die Sensordomäne der Histidin Protein Kinase (HPK) aufgenommen und über ihre Transmitterdomäne auf die Empfängerdomäne des „response regulator“ (RR) übertragen. Die regulatorische Domäne des RR leitet das Signal für die „Antwort“ der Zelle weiter. Die Signaltransduktion erfolgt durch die Übertragung einer aus ATP stammenden Phosphatgruppe (P) von einem Histidinrest (H) der HPK auf einen Asparaginrest (D). Die gepunkteten Pfeile stellen eine Reizübertragung innerhalb der Proteine dar.

Die Angiolam negativen Mutanten der Transposon-Mutantenbank könnten hypothetisch Beispiele für solch einen Schaltmechanismus sein. Da das *magellan4* eventuell nicht in das Angiolam-Biosynthesegencluster integriert ist, könnte die gesamte Angiolam-Produktion durch die Transposition in regulatorische Elemente ausgeschaltet sein.

Die Transposition in den Myxothiazol überproduzierenden Mutanten hat wahrscheinlich zur Inaktivierung von direkt oder indirekt negativ regulierenden Elementen geführt. Interessant ist, dass in den verschiedenen Mutanten die Integration des *magellan4* in einem jeweils anderen genomischen Bereich stattgefunden hat und zu einem ähnlichen Phänotypen führt. Ob es sich dabei um Gene eines einzelnen Regulationssystems handelt, wie z.B. einer komplexen Phosphorylierungskaskade, oder ob mehrere Regulationsmechanismen betroffen sind, ist ungeklärt. Des weiteren ist es außergewöhnlich, dass die negative Regulation der scheinbar konstitutiven Myxothiazol-Produktion im Wildtypen von *A. disciformis* An d48 erst in der stationären Wachstumsphase auftritt (s. 3.6.3, S.126). In dieser Phase tritt Nährstoffmangel in den Kulturen auf und es wurde angenommen, dass die Sekundärmetaboliten-Produktion aktiviert wird, falls sie als Signalstoffe für eine Zell-Zell-Kommunikation oder „Kampfstoff“ gegen Konkurrenz-Organismen wirken (in der Literatur gibt es über die Funktion der Sekundärmetabolite von Bakterien viele Spekulationen). Der Vergleich zwischen den gebildeten Mengen an Myxothiazol in den Mutanten und dem Wildtypen wirft folgende Frage auf: Warum wird die energetisch aufwendige Synthese des Myxothiazols in einer bestimmten Wachstumsphase durch negative Regulation auf einem konstanten Level gehalten? Eine Regulation der Synthese durch „Ein- bzw. Ausschalten“ wäre energetisch günstiger. Da die Funktion bzw. Bedeutung des Myxothiazols für die Bakterienzelle nicht klar ist, können diese Ergebnisse nur einen Einblick in die Komplexität der Regulationsmechanismen zur Synthese von Sekundärmetaboliten aufzeigen.

Aufgrund der identifizierten Myxothiazol überproduzierenden Klone in der Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 wurde postuliert, dass ebenso die Tubulysin-Produktion in *A. disciformis* An d48 durch Inaktivierung eines spezifischen negativ regulierenden Elements erhöht werden kann. Diese Mutante könnte für die Produktion von Tubulysin-Derivaten durch spezifische Mutageneseversuche verwendet werden.

Im Laufe der Diplomarbeit (2003) von Bettina Frank aus dieser Arbeitsgruppe wurde durch das etablierte Mutageneseprotokoll die Mutantenbank aus *A. disciformis* An48 um mehrere hundert Klone erweitert und mittels angepasstem Cytotoxizitätstest auf eine Tubulysin überproduzierende Mutante hin überprüft. In diesem Test wurden die Mutanten-Extrakte soweit verdünnt, dass keine Tubulysinwirkung mehr detektiert werden konnte. Tubulysin überproduzierende Mutanten sollten dadurch identifiziert werden, dass für die Aufhebung der Tubulysinwirkung mehr Verdünnungsschritte benötigt werden als im Vergleich zum Wildtypen von *A. disciformis* An d48. In dieser Arbeit konnte in der Tat eine Mutante identifiziert werden, die ca. viermal soviel Tubulysin D produziert wie der Wildtyp (insgesamt zeigte diese Mutante im Cytotoxizitätstest eine 10x höhere Tubulysin-Wirkung im Vergleich zum Wildtypen). Interessanterweise zeigt die Mutante (Mut158) ebenfalls eine achtfach höhere Produktion an Myxothiazol. Die Sequenzanalysen der angrenzenden genomischen Bereiche zum Transposon zeigten Homologien zu Serin/Threonin Kinasen. Diese Kinasen spielen zusammen mit Tyrosin Kinasen eine entscheidende Rolle in der Signaltransduktion von Eukaryonten, wo sie eine Vielzahl von zellulären Aktivitäten regulieren. Es wurde lange angenommen dass diese Kinasen nur in Eukaryonten vorkommen, obwohl einige biochemische Studien auf deren Existenz in Bakterien hindeuteten (Freestone *et al.*, 1995; Cozzzone, 1988). Munoz-Dorado *et al.* (1991) fanden erstmals in *M. xanthus* Gene, die für solch eine Eukaryonten-typische Kinase kodieren.

Myxobakterien zeichnen sich durch ein ausgeprägtes soziales Verhalten aus. Für die beteiligten, gerichteten Bewegungen und spezifischen Funktionen der Bakterien während der Fruchtkörperbildung (Shimkets, 1990; Reichenbach, 1986) benötigen sie Systeme die zur Zell-Zell-Kommunikation und Koordinierung der jeweiligen Interaktionen dienen. Die Regulation der Genexpression scheint dabei ein stark verzweigtes Netz zu sein, dass dem von Eukaryonten gleicht und nicht durch eine einfache Transkriptionskontrolle erklärt werden kann. Die Überproduktion von Tubulysin und Myxothiazol in der identifizierten Mutante Mut158 zeigt, dass die Produktion dieser Sekundärmetabolite zum Teil über ähnliche Mechanismen kontrolliert wird. Es ist zu vermuten das ähnlich komplexe Phosphorylierungskaskaden wie in Eukaryonten bestehen, die hierarchisch aufgebaut sind (Frank, 2003). Diese

Ergebnisse zeigen völlig neue Perspektiven für die Bedeutung der Regulation der Sekundärmetaboliten-Produktion in Myxobakterien auf.

5 Zusammenfassung

Wegen der Produktion einer Vielzahl cytotoxisch wirkender Sekundärmetabolite gehören die *Myxococcales* zu einer vielversprechenden Organismengruppe, in denen biochemische und genetische Untersuchungen zur Biosynthese dieser Verbindungen durchgeführt werden können. Neben Epothilonen und Disorazolen stellen die Tubulysine eine dritte Substanzklasse dar, die von Myxobakterien gebildet werden und auf das Mikrotubuli-Netzwerk eukaryontischer Zellen wirken. Das Ziel dieser Arbeit war die Auffindung und Charakterisierung des Tubulysin-Biosynthesegenclusters, um Einblicke in die Biosynthese dieser stark cytotoxisch wirkenden Substanz zu gewinnen. Diese Grundkenntnisse sollen in folgenden Arbeiten für die Erzeugung von Tubulysin-Derivaten eingesetzt werden, die als mögliche Krebstherapeutika eingesetzt werden können.

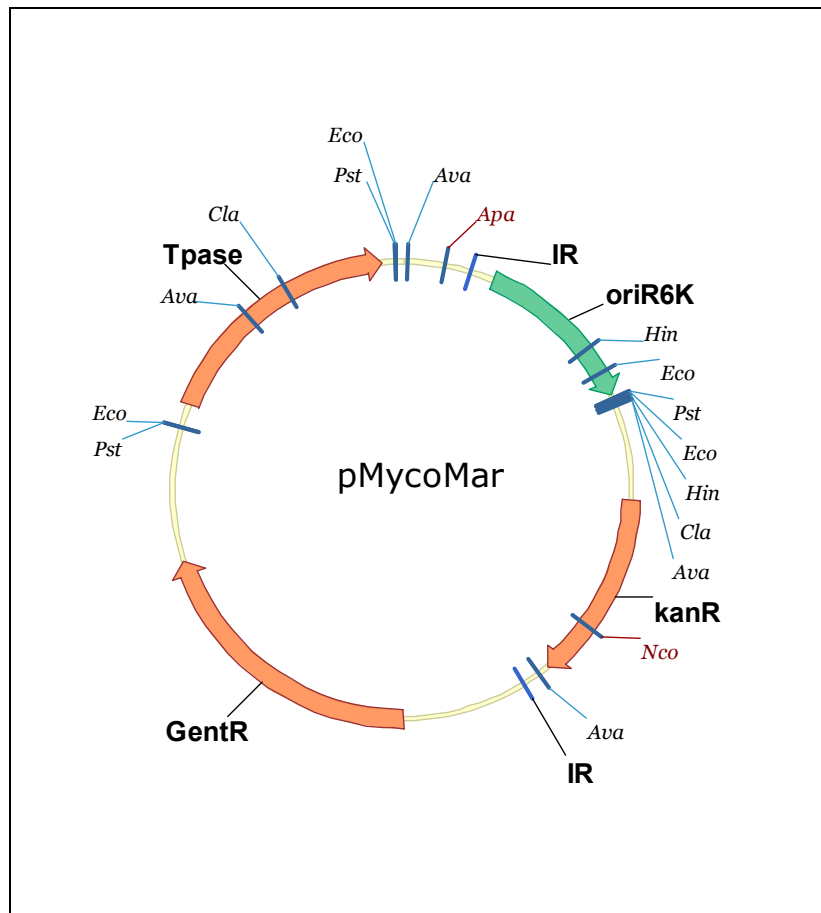
Durch die Etablierung eines Mutageneseprotokolls für den Tubulysin-Produzenten *A. disciformis* An d48 konnten nach Erzeugung einer Transposon-Mutantenbank vier Tubulysin negative Mutanten mittels eines optimierten biologischen Assays (Cytotoxizitätstest) identifiziert werden. Durch ein „Transposon-recovery“ und Sequenzanalyse der an den Integrationsort des Transposons *magellan4* angrenzenden genomischen Breiche in diesen Mutanten konnte das Tubulysin-Biosynthesegencluster aufgefunden und charakterisiert werden. Tubulysin wird durch ein Hybridsystem aus nichtribosomalen Peptidsynthetasen und Polyketidsynthasen des Typs I synthetisiert, die zusammen einen Multienzymkomplex bilden. Die Abfolge der Domänen innerhalb des Genclusters stimmt weitgehend mit der chemischen Struktur des Tubulysins überein. Es wurden einige ungewöhnliche und neue Aspekte im Aufbau für PKS- und NRPS-Systeme aufgedeckt.

In der generierten Transposon-Mutantenbank aus *A. disciformis* An d48 konnten durch HPLC-Analyse aller Mutantenextrakte weitere nicht Produzenten anderer Sekundärmetabolite, sowie auch überproduzierende Mutanten identifiziert werden. Durch die genetische und biochemische Charakterisierung verschiedener Myxothiazol

überproduzierender Mutanten konnte gezeigt werden, dass durch die Mutagenese Signalkaskaden getroffen sind, in die sowohl für Bakterien typische Zwei-Komponenten-Systeme wie auch für Eukaryonten repräsentative Serin/Threonin Kinasen involviert sind.

Durch diese Arbeit konnten somit nicht nur die Grundlagen für vertiefende Biosynthesestudien, sondern auch erste Einblicke in die Regulation der Sekundärmetaboliten-Bildung von Myxobakterien, speziell *A. disciformis* An d48 aufgezeigt werden.

6 Anhang



Das Plasmid pMycoMar (Rubin *et al.*, 1999)

Bei diesem Plasmid wurde das von *Himar1* abgeleitete Minitransposon *magellan4* in den temperatur-sensitiven mycobakteriellen Vektor pPR23 kloniert. Die vollständige Sequenz des pMycoMar ist nicht bekannt.

IR: Inverted Repeats, gent^R: Gentamycin-Resistenzgen, kan^R: Kanamycin-Resistenzgen, TPase: *Himar1*-Transposase, oriR6K: Replikationsursprung. Des weiteren sind die Erkennungssequenzen verschiedener Restriktionsenzyme markiert.

7 Literatur

Alex, L.A., and Simon, M.I. (1994) Protein histidine kinases and signal transduction in prokaryotes and eukaryotes. *Trends Genet.* **10**: 133-138.

Arslanian, R.L., Parker, C.D., Wang, P.K., McIntire, J.R., Lau, J., Starks, C., and Licari, P.J. (2002a) Large-scale isolation and crystallization of epothilone D from *Myxococcus xanthus* cultures. *Journal of Natural Products.* **65**: 570-572.

Arslanian, R.L., Tang, L., Blough, S., Ma, W., Qiu, R.G., Katz, L., and Carney, J.R. (2002b) A new cytotoxic epothilone from modified polyketide synthases heterologously expressed in *Myxococcus xanthus*. *Journal of Natural Products.* **65**: 1061-1064.

Bergendahl, V., Linne, U., and Marahiel, MA. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem.* **269**: 620-629.

Beyer, S., Kunze, B., Silakowski, B., and Müller, R. (1999) Metabolic diversity in myxobacteria - identification of the myxalamid and the stigmatellin biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* Sg a15 and a combined polyketide- (poly)peptide gene cluster from the epothilon producing strain *Sorangium cellulosum* So ce90. *Biochim Biophys Acta.* **1445**: 185-195.

Bibb, M.J., Findlay, P.R., and Johnson, M.W. (1984) The relationship between base composition and codon usage in bacterial genes and its use for the simple and reliable identification of protein-coding sequences. *Gene.* **30**: 157-166.

Bode, H., Irschik, H., Wenzel, S., Reichenbach, H., Müller, R., and Höfle, G. (2003) The Leupyrrins: A Structurally Unique Family of Secondary Metabolites from the Myxobacterium *Sorangium cellulosum*. *J Nat Prod.* **66**: 1203-1206.

Bollag, D.M., McQueney, P.A., Zhu, J., Hensens, O., Koupal, L., Liesch, J., Goetz, M., Lazarides, E., and Woods, C.M. (1995) Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with Taxol-like mechanism of action. *Cancer Research.* **55**: 2325-2333.

Bourret, R.B., Davagnino, J., and Simon, M.I. (1993) The carboxy-terminal portion of the CheA kinase mediates regulation of autophosphorylation by transducer and CheW. *J Bacteriol.* **175**: 2097-2101.

Cane, D.E., and Walsh, C.T. (1999) The parallel and convergent universes of polyketide synthases and nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**: R319-R325.

Cane, D.E.e. (1997) Polyketide and Nonribosomal Polypeptide Biosynthesis. *Chemical Reviews.* **97**: 2463-2706.

- Carroll, B.J., Moss, S.J., Bai, L.Q., Kato, Y., Toelzer, S., Yu, T.W., and Floss, H.G. (2002) Identification of a set of genes involved in the formation of the substrate for the incorporation of the unusual "glycolate" chain extension unit in ansamitocin biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*. **124**: 4176-4177.
- Challis, G., Ravel, J., and Townsend, C. (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chem Biol*. **7**: 211-224.
- Chang, Z.X., Flatt, P., Gerwick, W.H., Nguyen, V.A., Willis, C.L., and Sherman, D.H. (2002) The barbamide biosynthetic gene cluster: a novel marine cyanobacterial system of mixed polyketide synthase (PKS)-non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) origin involving an unusual trichloroleucyl starter unit. *Gene*. **296**: 235-247.
- Chen, H., Keseler, I.M., and Shimkets, L.J. (1990) Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Bacteriol*. **172**: 4206-4213.
- Chen, H.W., O'Connor, S., Cane, D.E., and Walsh, C.T. (2001) Epothilone biosynthesis: assembly of the methylthiazolylcarboxy starter unit on the EpoB subunit. *Chem Biol*. **8**: 899-912.
- Cheng, Y.-Q., Tang, G.-L., and Shen, B. (2002) Identification and Localization of the Gene Cluster Encoding Biosynthesis of the Antitumor Macrolactam Leinamycin in *Streptomyces atroolivaceus* S-140. *J. Bacteriol*. **184**: 7013-7024.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A., and Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J*. **16**: 4174-4183.
- Cosmina, P., Rodriguez, F., de Ferra, F., Grandi, G., Perego, M., Venema, G., and van Sinderen, D. (1993) Sequence and analysis of the genetic locus responsible for surfactin synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. **8**: 821-831.
- Cozzone, A.J. (1988) Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu Rev Microbiol*. **42**: 97-125.
- Dawid, W. (1979) Occurrence and distribution of fruiting body-forming myxobacteria in Siebengebirge. Comparative studies with special reference to characteristic biotypes. *Z Allg Mikrobiol*. **19**: 705-719.
- De Crecy-Lagard, V., Marliere, P., and Saurin, W. (1995) Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. *C R Acad Sci III*. **318**: 927-936.
- Donadio, S., and Katz, L. (1992) Organization of the enzymatic domains in the multifunctional polyketide synthase involved in erythromycin formation in *Saccharopolyspora erythraea*. *Gene*. **111**: 51-60.

- Donadio, S., Staver, M.J., McAlpine, J.B., Swanson, S.J., and Katz, L. (1991) Modular organization of genes required for complex polyketide biosynthesis. *Science*. **252**: 675-679.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M.T., Edwards, D., and Shen, B. (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol*. **7**: 623-642.
- Du, L., Chen, M., Sanchez, C., and Shen, B. (2000) An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. *FEMS Lett*. **189**: 171-175.
- Du, L.H., Sanchez, C., and Shen, B. (2001) Hybrid peptide-polyketide natural products: Biosynthesis and prospects toward engineering novel molecules. *Metabolic Engineering*. **3**: 78-95.
- Elnakady, Y.A., Sasse, F., Lünsdorf, H., and Reichenbach, H. (2004) Disorazol A₁ highly effective antimitotic agent acting on tubulin polymerization and inducing apoptosis in mammalian cells. *Biochemical Pharmacology*. **67**: 927-935.
- Ferrer, J.-L., Jez, J., Bowman, M., Dixon, R., and Noel, J. (1999) Structure of chalcone synthase and the molecular basis of plant polyketide biosynthesis. *Nature Structural Biology*. **6**: 775-784.
- Frank, B. (2003) Untersuchungen zur Optimierung der Tubulysin-Produktion im Myxobakterium *Angiococcus disciformis* An d48. *Diplomarbeit*. Braunschweig: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF).
- Freestone, P., Grant, S., Toth, I., and Norris, V. (1995) Identification of phosphoproteins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **15**: 573-580.
- Fujii, I. (1999) in *Comprehensive Natural Products Chemistry*. In: Sanakawa, U. (ed.) Oxford: Elsevier, pp. 409-441.
- Funa, N., Ohnishi, Y., Fujii, I., Shibuya, M., Ebizuka, Y., and Horinouchi, S. (1999) A new pathway for polyketide synthesis in microorganisms. *Nature*. **400**: 897-899.
- Gehring, A.M., Mori, I., Perry, R.D., and Walsh, C.T. (1998) The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. *Biochemistry*. **37**: 11637-11650.
- Gerth, K., Pradella, S., Perlova, O., Beyer, S., and Müller, R. (2003) Myxobacteria: Proficient producers of novel natural products with various biological activities - past and future biotechnological aspects with the focus on the genus *Sorangium*. *J Biotechnol*. **in press**.

- Gerth, K., Jansen, R., Reifensahl, G., Höfle, G., Irschik, H., Kunze, B., Reichenbach, H., and Thierbach, G. (1983) The myxalamids, new antibiotics from *Myxococcus xanthus* (myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *J. Antibiot.* **36**: 1150-1156.
- Grebe, T.W., and Stock, J.B. (1999) The histidine protein kinase superfamily. *Adv Microb Physiol.* **41**: 139-227.
- Gronewold, T.M., Sasse, F., Lunsdorf, H., and Reichenbach, H. (1999) Effects of rhizopodin and latrunculin B on the morphology and on the actin cytoskeleton of mammalian cells. *Cell Tissue Res.* **295**: 121-129.
- Guenzi E, G.G., Grgurina I, Gross DC, and Grandi G. (1998) Characterization of the syringomycin synthetase gene cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *J Biol Chem.* **273**: 32857-23863.
- Hakenbeck, R., and Stock, J.B. (1996) Analysis of two-component signal transduction systems involved in transcriptional regulation. *Methods Enzymol.* **273**: 281-300.
- Hanahan, D. (1985) *In DNA cloning Volume I*. Washinton DC: IRL Press.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., and Hunter, T. (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241**: 42-52.
- Haydock, S., Aparicio, J.F., Molnar, I., Schwecke, T., Khaw, L.E., König, A., Marsden, A.F., Galloway, I.S., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1995) Divergent structural motifs correlated with the substrate specificity of (methyl)malonyl-CoA:acylcarrier protein transacylase domains in the modular polyketide synthases. *FEBS Lett.* **374**: 246-248.
- Hendrickson, L., Davis, C.R., Roach, C., Nguyen, D.K., Aldrich, T., McAda, P.C., and Reeves, C.D. (1999) Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem. Biol.* **6**: 429-439.
- Hillson, N.J., and Walsh, C.T. (2003) Dimeric structure of the six-domain VibF subunit of vibriobactin synthetase: Mutant domain activity regain and ultracentrifugation studies. *Biochemistry.* **42**: 766-775.
- Hoppert, M., Gentzsch, C., and Schorgendorfer, K. (2001) Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*. *Arch Microbiol.* **176**: 285-293.
- Hopwood, D. (1997) Genetic contributions to understanding polyketide synthases. *Chem. Rev.* **97**: 2465-2497.
- Huang, W., Jia, J., Edwards, P., Dehesh, K., Schneider, G., and Lindqvist, Y. (1998) Crystal structure of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase II from *E.coli* reveals the molecular architecture of condensing enzymes. *EMBO J.* **17**: 1183-1191.
- Hunter, T. (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell.* **80**: 225-236.

- Irschik, H., Gerth, K., Kemmer, T., Steinmetz, H., and Reichenbach, H. (1983) The Myxovalargins, new peptide antibiotics from *Myxococcus fulvus* (Myxobacterales) I. Cultivation, isolation, and some chemical and biological properties. *J. Antibiotics*. **36**: 6-12.
- Kagan, R.M., and Clarke, S. (1994) Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggest a common structure for these enzymes. *Arch Biochem Biophys*. **310**: 417-427.
- Kakavas, S.J., Katz, L., and Stassi, D. (1997) Identification and characterization of the niddamycin polyketide synthase genes from *Streptomyces caelestis*. *J. Bacteriol*. **179**: 7515-7522.
- Kashefi, K., and Hartzell, P.L. (1995) Genetic suppression and phenotypic masking of a *Myxococcus xanthus* frzF- defect. *Mol Microbiol*. **15**: 483-494.
- Keating, T.A., and Walsh, C.T. (1999) Initiation, elongation, and termination strategies in polyketide and polypeptide antibiotic biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*. **3**: 598-606.
- Khalil, M.W. (1999) Tubulysin aus Myxobakterien. Untersuchungen zum Wirkmechanismus. *Dissertationsschrift*: TU Carolo-Wilhelmina in Braunschweig.
- Khaw, L.E., Bohm, G.A., Metcalfe, S., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1998) Mutational biosynthesis of novel rapamycins by a strain of *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 5491 disrupted in rapL, encoding a putative lysine cyclodeaminase. *J Bacteriol*. **180**: 809-814.
- Kleinkauf, H., and von Döhren, H. (1997) Products of Secondary Metabolism. In *Biotechnology*. Kleinkauf, H., and von Döhren, H. (eds.) Weinheim: Verlag Chemie, pp. 277-322.
- Kleinkauf, H., van Liempt, H., Palissa, H., and von Dohren, H. (1992) Biosynthesis of peptides: a non-ribosomal system. *Naturwissenschaften*. **79**: 153-162.
- Konz, D., and Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol*. **6**: R39-48.
- Konz, D., Doekel, S., and Marahiel, M.A. (1999) Molecular and biochemical characterization of the protein template controlling biosynthesis of the lipopeptide lichenysin. *Journal Of Bacteriology*. **181**: 133-140.
- Konz, D., Klens, A., Schorgendorfer, K., and Marahiel, M.A. (1997) The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. *Chem. Biol*. **4**: 927-937.
- Kunze, B., Kemmer, T., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1984) Stigmatellin, a new antibiotic from *Stigmatella aurantiaca* (myxobacterales). I. Production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot*. **37**: 454-461.

- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C., and Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem. Biol.* **3**: 923-936.
- Lampe, D.J., Churchill, M.E., and Robertson H.M. (1996) A purified *mariner* transposase is sufficient to mediate transposition *in vitro*. *EMBO J.* **15**: 5470-5479.
- Lewendon, A., Murray, I.A., Shaw, W.V., Gibbs, M.R., and Leslie, A.G. (1994) Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate. *Biochemistry*. **33**: 1944-1950.
- Mandel, M.A., and Leadbetter, E.R. (1965) Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. *Journal of biotechnology*. **90**: 1795-1796.
- Marahiel, M.A. (1997) Protein templates for the biosynthesis of peptide antibiotics. *Chem Biol.* **4**: 561-567.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T., and Mootz, H.D. (1999) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chemical Reviews*. **97**: 2651-2674.
- Mc Curdy, H.D., and Wolf, S. (1967) Deoxyribonucleic acid base compositions of fruiting Myxobacteriales. *Can J Microbiol.* **13**: 1707-1708.
- Miller, J.H. (1972) *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Molnar, I., Aparicio, J.F., Haydock, S.F., Khaw, L.E., Schwecke, T., König, A., Staunton, J., and Leadlay, P.F. (1996) Organisation of the biosynthetic gene cluster for rapamycin in *Streptomyces hygroscopicus*: analysis of genes flanking the polyketide synthase. *GENE*. **169**: 1-7.
- Moore, B.S., and Höpke, J.N. (2001) Discovery of a new bacterial polyketide biosynthetic pathway. *ChemBioChem*. **2**: 35-38.
- Muth, W.L., and Costilow, R.N. (1974) Ornithine cyclase (deaminating). III. Mechanism of the conversion of ornithine to proline. *J. Biol. Chem.* **249**: 7463-7467.
- Nishizawa, T., Asayama, M., and Shirai, M. (2001) Cyclic heptapeptide microcystin biosynthesis requires the glutamate racemase gene. *Microbiology-Sgm.* **147**: 1235-1241.
- Parkinson, J.S., and Kofoed, E.C. (1992) Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu Rev Genet.* **26**: 71-112.
- Piel, J. (2002) A polyketide synthase-peptide synthetase gene cluster from an uncultured bacterial symbiont of *Paederus* beetles. *PNAS*. **99**: 14002-14007.
- Pradella, S., Hans, A., Spröer, C., Reichenbach, H., Gerth, K., and Beyer, S. (2002) Characterisation, genome size and genetic manipulation of the myxobacterium *Sorangium cellulosum* So ce56. *Arch Microbiol.* **178**: 484-492.
- Reichenbach, H. (1984) *in Myxobacteria, Development and Cell Interaction*: Springer Verlag.

- Reichenbach, H. (1986) The myxobacteria: common organisms with uncommon behaviour. *Microbiol Sci.* **3**: 268-274.
- Reichenbach, H. (1999/2000) Biology and Chemistry of microbial compounds (SP 3.1). In *Scientific Annual Report* Braunschweig: Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, pp. 97-100.
- Reichenbach, H. (2001) Myxobacteria, producers of novel bioactive substances. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **27**: 149-156.
- Robertson, H.M., and Lampe, D.J. (1995) Recent horizontal transfer of a mariner transposable element among and between Diptera and Neuroptera. *Mol Biol Evol.* **12**: 850-862.
- Rouhiainen, L., Paulin, L., Suomalainen, S., Hyytiäinen, H., Buikema, W., Haselkorn, R., and Sivonen, K. (2000) Genes encoding synthetases of cyclic depsipeptides, anabaenopeptilides, in *Anabaena* strain 90. *Mol Microbiol.* **37**: 156-167.
- Rubin, E., Akerley, B., Novik, V., Lampe, D., Husson, R., and Mekalanos, J. (1999) *In vivo* transposition of *mariner*-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**: 1645-1650.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5463-5467.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1993) Rhizopodin, a new compound from *Myxococcus stipitatus* (myxobacteria) causes formation of rhizopodia-like structures in animal cell cultures. Production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo).* **46**: 741-748.
- Sasse, F., Kunze, B., Gronewold, T.M., and Reichenbach, H. (1998) The chondramides: cytostatic agents from myxobacteria acting on the actin cytoskeleton. *Journal Of The National Cancer Institute.* **90**: 1559-1563.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Heil, J., Höfle, G., and Reichenbach, H. (2000) Tubulysins, new cytostatic peptides from myxobacteria acting on microtubuli - production, isolation, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **53**: 879-885.
- Sasse, F., Steinmetz, H., Höfle, G., and Reichenbach, H. (1995) Gephyronic acid, a novel inhibitor of eukaryotic protein synthesis from *Archangium gephyra* (myxobacteria). Production, isolation, physico-chemical and biological properties, and mechanism of action. *Journal of Antibiotics.* **48**: 21-25.
- Schlegel, H.G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag.

- Shen, B., Du, L., Sanchez, C., Edwards, D.J., Chen, M., and Murrell, J.M. (2001) The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **27**: 378-385.
- Shimkets, L. (1993) The myxobacterial Genome. In *Myxobacteria II*. Dworkin, M., and Kaiser, D. (eds.) Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 85-108.
- Shimkets, L.J. (1990) Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol Rev.* **54**: 473-501.
- Shuman, S. (1994) Novel approach to molecular cloning and polynucleotide synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. *J Biol Chem.* **269**: 32678-32784.
- Silakowski, B., Ehret, H., and Schairer, H.U. (1998) *fbfB*, a gene encoding a putative galactose oxidase, is involved in *Stigmatella aurantiaca* fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **180**: 1241-1247.
- Silakowski, B., Kunze, B., and Müller, R. (2001a) Multiple hybrid polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Gene.* **275**: 233-240.
- Silakowski, B., Nordsiek, G., Kunze, B., Blöcker, H., and Müller, R. (2001b) Novel features in a combined polyketide synthase/non-ribosomal peptide synthetase: The myxalamid biosynthetic gene cluster of the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca* Sg a15. *Chem Biol.* **8**: 59-69.
- Silakowski, B., Schairer, H.U., Ehret, H., Kunze, B., Weinig, S., Nordsiek, G., Brandt, P., Blöcker, H., Höfle, G., Beyer, S., and Müller, R. (1999) New lessons for combinatorial biosynthesis from Myxobacteria: The myxothiazol biosynthetic gene cluster of *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1. *J Biol Chem.* **274**: 37391-37399.
- Smith, S. (1994) The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB Journal.* **8**: 1248-1259.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**: 493-505.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V., and Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *Journal Of Biological Chemistry.* **273**: 22773-22781.
- Staunton, J., and Weissman, K.J. (2001) Polyketide biosynthesis: a millennium review. *Nat Prod Rep.* **18**: 380-416.
- Steinmetz, H., Glaser, N., Herdtweck, E., Sasse, F., and Höfle, G. (2004) *Angewandte Chemie - International Edition in English.* **eingereicht**.
- Stock, J.B., Ninfa, A.J., and Stock, A.M. (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.* **53**: 450-490.

- Tang, L., Yoon, Y.J., Choi, C.Y., and Hutchinson, C.R. (1998) Characterization of the enzymatic domains in the modular polyketide synthase involved in rifamycin B biosynthesis by *Amycolatopsis mediterranei*. *Gene*. **216**: 255-265.
- Thierbach, G., and Reichenbach, H. (1981) Myxothiazol, a new inhibitor of the cytochrome b-c1 segment of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta*. **638**: 282-289.
- Tillett, D., Dittmann, E., Erhard, M., von Döhren, H., Börner, T., and Neilan, B.A. (2000) Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system. *Chem Biol*. **7**: 753-764.
- Ueki, T., Inouye, S., and Inouye, M. (1996) Positive-negative KG cassettes for construction of multi-gene deletions using a single drug marker. *Gene*. **183**: 153-157.
- Vahlensieck, H.F., Pridzun, L., Reichenbach, H., and Hinnen, A. (1994) Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. *Curr Genet*. **25**: 95-100.
- Vollenweider, I., and Groscurth, P. (1992) Comparison of four DNA staining fluorescence dyes for measuring cell proliferation of lymphokine-activated killer (LAK) cells. *Journal of Immunol Methods*. **149**: 133-135.
- Weinig, S., Mahmud, T., and Müller, R. (2003a) Markerless Mutations in the Myxothiazol Biosynthetic Gene Cluster: A Delicate Megasynthetase with a Superfluous Nonribosomal Peptide Synthetase Domain. *Chemistry & Biology*. **10**: 953-960.
- Weinig, S., Hecht, H.-J., Mahmud, T., and Müller, R. (2003b) Melithiazol Biosynthesis: Further Insights into Myxobacterial PKS/NRPS Systems and Evidence for a New Subclass of Methyl Transferases. *Chemistry & Biology*. **10**: 939-952.
- Wickwire, B.M., Wagner, C., and Broquist, H.P. (1990) Pipecolic acid biosynthesis in *Rhizoctonia leguminicola*. II. Saccharopine oxidase: a unique flavin enzyme involved in pipecolic acid biosynthesis. *J Biol Chem*. **265**: 14748-14753.
- Wierenga, R.K., Drenth, J., and Schulz, G.E. (1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J Mol Biol*. **167**: 725-739.
- Wu, S.S., and Kaiser, D. (1996) Markerless deletions of pil genes in *Myxococcus xanthus* generated by counterselection with the *Bacillus subtilis* *sacB* gene. *J. Bacteriol*. **178**: 5817-5821.
- Yadav, G., Gokhale, R.S., and Mohanty, D. (2003) SEARCHPKS: a program for detection and analysis of polyketide synthase domains. *Nucleic Acids Research*. **31**: 3654-3658.

Zhu, G., LaGier, M.J., Stejskal, F., Millership, J.J., Cai, X., and Keithly, J.S. (2002) *Cryptosporidium parvum*: the first protist known to encode a putative polyketide synthase. *Gene*. **298**: 79-89.